

UNIVERSIDAD CENTRAL (MADRID)
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Transformación de esteroides por vía microbiológicas :
análisis de la comunidad antigénica entre las proteínas
constitutivas e inducidas en las transformaciones de
esteroides del bacillus sphaericus y del Arthrobacter simplex**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Raúl Martín Rodríguez

DIRECTOR:

Andrés Chordi Corbo

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5305312883

T579.6

MAR

era

TRANSFORMACION DE ESTEROIDES POR VIA MICROBIOLOGICA:
ANALISIS DE LA COMUNIDAD ANTIGENICA ENTRE LAS PRO -
TEINAS CONSTITUTIVAS, E INDUCIDAS EN LAS TRANSFOR -
MACION DE ESTEROIDES DEL BACILLUS SPHAERICUS Y DEL
ARTHROBACTER SIMPLEX.



Trabajo presentado para obter
el grado de Doctor en Farmacia
por Raúl Martín Rodríguez

Noviembre, 1.973.

R.- 20.197

Este ejemplar ha sido revisado
por el Catedrático-Director.

A handwritten signature in cursive script, likely belonging to the Catedrático-Director mentioned in the text above. The signature is written in dark ink and is positioned below the printed text.

Los trabajos comprendidos en esta Memoria fueron realizados en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de La Laguna, durante los años 1970 a 1973.

Expreso mi agradecimiento al Prof. D. Andrés Chordi por su acertada y constante Dirección, así como al Ponente, Prof. D. Lorenzo Vilas.

La parte química del presente trabajo fue realizada en los Laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la mencionada Facultad y en los Laboratorios del Instituto de Investigaciones Químicas de Tenerife, del C.S.I.C., a cuyo Director, Prof, D. Antonio González, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por las facilidades dadas, así como a los demás miembros de los mencionados laboratorios por su ayuda desinteresada y cordial.

	<u>Página</u>
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
I. Consideraciones históricas.....	2
I.1. Transformación microbiológica de esteroides.....	6
I.1.1. Primeras hidroxilaciones....	7
I.1.2. Primeras deshidrogenacio nes.....	8
I.1.3. Obtención de corticosteroi- des naturales o sintéticos...	12
I.1.4. Nuevas perspectivas en este campo.....	13
I.2. El papel de las enzimas en las transformaciones microbianas de esteroides.....	17
I.2.1. Especificidad de las enzi- mas en las transformacio - nes microbianas de esteroi des.....	22
I.3. Objetivos.....	25
II. <u>MATERIAL Y METODOS</u>	31
II.1. Cultivo de los microorganismos.....	32

II.1.1. Microorganismos utili	
zados.....	32
II.1.2. Cultivo de los microor	
ganismos.....	
II.1.3. Cultivo de los microor	
ganismos con Naranja de	
Acridina.....	
II.1.4. Adición del sustrato este	
roide.....	40
II.2. Preparados antigénicos.....	41
II.2.1. Sobrenadante de los cul-	
tivos.....	41
II.2.2. Células desecadas por	
acetona.....	42
II.2.2.1. Antígenos para inmuni	
zar.....	42
II.2.2.2. Preparación de antíge	
no el análisis antigé	
nico.....	43
II.3. Técnicas auxiliares.....	49
II.3.1. Pervaporación.....	49
II.3.2. Determinación del contenido	
protéico.....	49
II.3.3. Diálisis.....	49



	<u>Página</u>
II.3.4. Absorción de inmunosueros.....	49
II.4. Inmunosueros.....	51
II.4.1. Pauta de inmunización.....	51
II.4.2. Sangrías y obtención de sue- ros.....	52
II.4.3. Titulación.....	55
II.4.3.1. Soporte semisólido.....	55
II.4.3.2. Preparación de las placas.....	56
II.4.3.3. Disposición de los pocillos.....	56
II.4.3.4. Colocación de las muestras.....	58
II.4.3.5. Difusión y precipita- ción.....	58
II.4.3.6. Lavado y secado.....	58
II.4.3.7. Tinción.....	59
II.4.3.8. Lectura y elección.....	60
II.5. Técnicas analíticas de proteínas.....	61
II.5.1. Electroforesis simple en gel de agar.....	61
II.5.1.1. Condiciones generales...	62
II.5.1.2. Soporte semisólido.....	62
II.5.1.3. Preparación de las placas.....	62

II.5.1.4. Disposición de los pocillos.....	62
II.5.1.5. Colocación de las muestras.....	63
II.5.1.6. Control.....	63
II.5.1.7. Conexión eléctrica.....	63
II.5.1.8. Tinción y revelados diversos.....	64
II.5.1.9. Cálculo de movilidades...	64
II.5.1.9.1. Movilidades absolutas.....	65
II.5.1.9.2. Movilidades relativas.....	66
II.6. Técnicas analíticas de esteroides.....	67
II.6.1. Adición del sustrato.....	67
II.6.2. Extracción de los productos de reacción.....	67
II.6.3. Análisis de los componentes extraídos.....	69
II.6.3.1. Análisis de los componentes extraídos con acetato de etilo.....	69
II.6.3.2. Análisis de la fracción acuosa.....	69

	<u>Página</u>
II.6.4. Cromatografía en capa fina....	70
II.6.5. Cromatografía en columna.....	71
II.6.6. Punto de fusión.....	71
II.6.7. Espectros infrarrojos.....	71
II.6.8. Espectros ultravioletas.....	71
II.6.9. Espectros de Resonancia Magné- tica Nuclear.....	72
II.7. Estudio inmunológico.....	73
II.7.1. Inmunodifusión.....	73
II.7.1.1. Preparación del soporte semisólido.....	73
II.7.1.2. Lectura de los resulta- dos.....	75
II.7.2. Inmunoelectroforesis.....	78
II.7.2.1. Material.....	78
II.7.2.2. Preparación de los portaobjetos.....	78
II.7.2.3. Electroforesis.....	79
II.7.2.4. Inmunodifusión.....	79
II.7.2.5. Lectura y Resultados...	80
II.7.2.6. Reforzamiento de las bandas de inmunodifu- sión por ácido tánico..	80

II.7.2.7. Tinción de proteí-	
nas.....	81
II.7.2.8. Cálculo de movilidades	
de las bandas de preci-	
pitación.....	81
II.7.2.8.1. Movilidad absoluta	82
II.7.2.8.2. Movilidad relativa	82
II.8. Sistemática de estudio.....	82
III. <u>RESULTADOS</u>	94
III.1. Análisis antigénico directo del	
Bacillus sphaericus sin esteroides..	95
III.1.1. Proceso de inmunización.....	96
III.1.2. Análisis antigénico.....	103
III.2. Análisis antigénico directo del Ar-	
throbacter simplex sin esteroides...	108
III.2.1. Proceso de inmunización.....	108
III.2.2. Análisis antigénico.....	109
III.3. Análisis antigénico directo del B.	
sphaericus con adición de esteroides	116
III.3.1. Proceso de inmunización.....	116
III.3.2. Análisis antigénico.....	117
III.4. Análisis antigénico directo del A.	
simplex con esteroides.....	118

III.4.1. Proceso de inmunización.....	118
III.4.2. Análisis antigénico.....	119
III.5. Estudio de la inducción y represión en zimática.....	120
III.5.1. Estudio de la inducción y repre sión enzimática en el B. sphae ricus.....	125
III.5.1.1. Componentes no modifica dos de los sistemas B S E y B C E.....	125
III.5.1.2. Componentes reprimidos del B. sphaericus.....	130
III.5.1.3. Componentes inducidos del B. sphaericus.....	132
III.5.1.4. Composición antigénica to tal del B. sphaericus de ducida de los resultados anteriores.....	137
III.5.1.5. Composición antigénica to tal del B. sphaericus con esteroides,deducida de los resultados anteriores	139
III.5.2. Estudio de la represión e induc ción enzimática en el A. simplex	143

III.5.2.1. Componentes no modificados en los sistemas sin esteroides y con esteroides.....	144
III.5.2.2. Sistemas reprimidos del A. simplex.....	149
III.5.2.3. Sistemas inducidos del A. simplex.....	151
III.5.2.4. Composición antigénica total del A. simplex.....	157
III.5.2.5. Composición antigénica total del A. simplex con esteroides.	160
III.5.3. Análisis antigénico cruzado del B. sphaericus y el A. simplex.....	166
II.5.3.1. Componentes comunes directos a ambas especies.....	168
II.5.3.2. Componentes comunes reprimidos.....	174

III.5.3.3. Componentes comunes	
inducidos.....	177
III.5.3.4. Composición antigénica común total, de	
ducida de los resultados anteriores.....	181
III.5.3.5. Comprobaciones complementarias de las	
comunidades antigénicas.....	184
III.6. Estudio de la transformación de	
los esteroides.....	194
III.6.1. Estudio del A. simplex.....	197
III.6.2. Estudio del A. simplex con	
Naranja de Acridina.....	201
III.6.3. Estudio del B. sphaericus..	204
III.6.4. Estudio del B. sphaericus	
con Naranja de Acridina....	207
III.7. Cultivos con Naranja de Acridina..	220
IV. <u>DISCUSION</u>	232
V. <u>CONCLUSION</u>	262
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	266

I.-INTRODUCCION

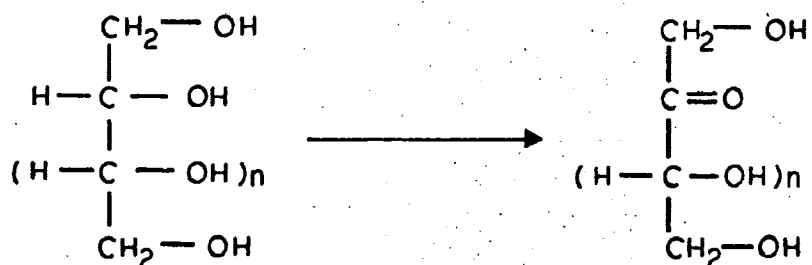
INTRODUCCION.

I. Consideración histórica.

Las transformaciones bacterianas de compuestos orgánicos han sido conocidas, empíricamente, desde los inicios de la historia humana. En cuanto las civilizaciones primitivas fueron avanzando en su conocimiento de la Naturaleza, comenzaron a practicar la fermentación de diversos frutos, granos y leche, para obtener otras sustancias derivadas de ellos, que utilizaron en la alimentación, etc. Hay evidencias de la producción de vinos, desde el año 3.000 a. C., según se encontró en las excavaciones en Lachisch y otros lugares.

La aplicación racional de estas primitivas técnicas comenzó, solamente, cuando se conocieron los fundamentos científicos de las técnicas de Química Orgánica y Microbiología. Los primeros conocimientos obtenidos permitieron a Pasteur en 1857 desarrollar sus estudios sobre la fermentación del azúcar a ácido láctico y etanol. Este investigador, elucidó por primera vez, el concepto de que especies individuales de microorganismos eran responsables de la alteración química de determinadas sustancias. Estos experimentos y su publicación, señaló el nacimiento de la microbiología de las fermentaciones.

Después de Pasteur y hasta el final del siglo XIX, se efectuaron pocos estudios sobre la aplicación de los microorganismos en la Química Orgánica. En los comienzos del año 1869, Bertrand, efectuó exhaustivos estudios los procesos oxidativos que resultaban de la acción del *Acetobacter xylinum* sobre una serie de alcoholes polihídricos, estableciendo el siguiente esquema:

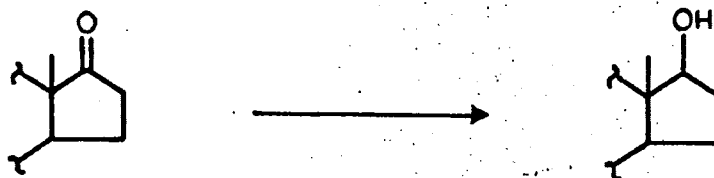


Estos hechos condujeron a la "regla de Bertrand" que decía que un par de grupos hidroxilos secundarios, en posición cis, establecían las condiciones necesarias para que la oxidación tuviese lugar. Esta reacción tuvo gran importancia, ya que permitió la conversión de sorbitol a 1- sorbosa, un producto intermedio en la obtención de la vitamina C. También la dihidroxiacetona, utilizada en cosmética, puede ser obtenida en escala comercial por esta vía mediante el *Acetobacter suboxydans*.

Siguiendo los trabajos de Bertrand, Lintner y von Liebig, encontraron que las levaduras fermentativas,

reducían el furfural al furfurol. Neuberg y su escuela exploraron la utilización de levaduras en la fermentación de sustratos muy diversos. Sus estudios fueron recopilados por Fischer (1948) y Stodola (1958).

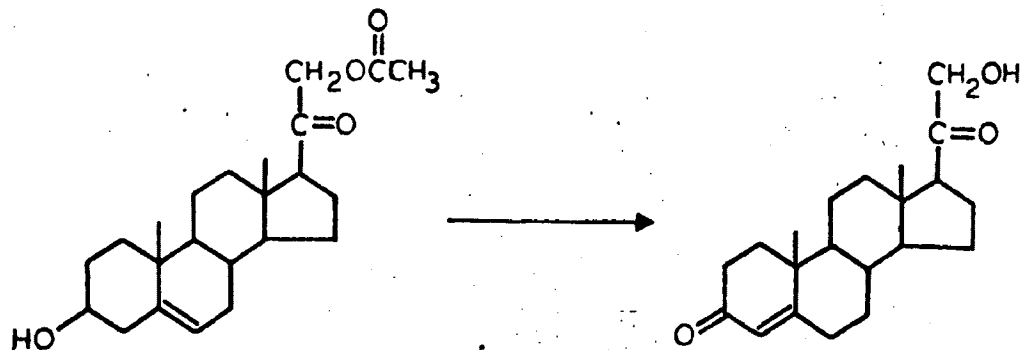
Los sustratos esteroideos fueron utilizados por primera vez en 1937 por Mamoli y Vercellone, que continuaron los trabajos de la escuela de Neuberg. Estos investigadores demostraron que las levaduras fermentativas pueden ser usadas para reducir los 17-cetoesteroides a 17 β -hidroxiesteroides. Este método es un paso importante en la síntesis de la hormona masculina, testoterona:



Así como la hormona femenina, estradiol, pero que es obtenida por otros métodos químicos más convenientes.

De la misma forma, utilizando cultivos impuros de levaduras, Mamoli y Vercellone, descubrieron la secuencia de las reacciones de oxidación-isomerización atribuidas anteriormente a la acción de contaminantes bacterianos. Una transformación demostrativa de este tipo, es la

conversión de 3 β -21-dihidroxi-5-pregnen-20-ona, 21 aceto, a deoxicorticosterona, por *Corynebacterium mediolanum*. Schering, en los Estados Unidos, utiliza un proceso similar para la obtención de la Sustancia S de Reichstein, 17 α -21-dihidroxi-4-pregnen-3,20 diona.



Considerar, pues, a Mamoli como el pionero de la aplicación de los métodos microbiológicos a la química de los esteroides, es lo lógico, habiendo sido estos trabajos efectuados muy poco tiempo después de aclarada la estructura química de estas sustancias.

Durante el período de 1940 a 1949, decreció el interés por la transformación microbiológica de los esteroides, al irse descubriendo métodos químicos para su obtención. No obstante, pronto se comprobó la limitación de estas técnicas que permitían la obtención de compuestos y transformaciones, que, o bien eran difíciles o prácticamente imposible de obtener de forma química, o que presentaban ventajas económicas considerables, utilizando las

transformaciones microbiológicas, estando actualmente estas técnicas en primera línea de actualidad.

I.1. Transformación Microbiológica de esteroides.

El descubrimiento de las posibilidades terapéuticas de la cortisona en la artritis reumatoide, polarizó el interés de los investigadores hacia la obtención masiva de esta sustancia, mediante técnicas sintéticas, que abaratasen su preparación. Sarett y otros, estuvieron trabajando en la síntesis parcial de las sustancias adrenocorticales y, en 1.946, consiguió la primera síntesis total de la cortisona. La cortisona utilizada en el experimento de Hench y Kendall, (1950), fue preparada por los laboratorios Merck basándose en los métodos sintéticos elaborados por Sarett y Kendall y sus colaboradores. Como es bien sabido, Hendh, Kendall y Reichstein, obtuvieron el premio Nobel por el descubrimiento de las posibilidades terapéuticas del acetato de cortisona en la artritis reumatoide.

El punto de partida de Sarett y Kendall para la síntesis de esta sustancia fue el ácido deoxicólico, que era obtenido a partir de la bilis bovina. Uno de los puntos fundamentales era la introducción del átomo de

oxígeno 11.

Cuando Merck, en 1949 y Schering en 1951, comen-
zaron a fabricar cortisona a partir del ácido desoxicóli-
co, Peterson y Murray, bioquímico y microbiólogo de la
compañía Upjohn, descubrieron que era más fácil la intro-
ducción del oxígeno en 11 mediante la acción del microor-
ganismo. Ellos fueron continuadores de la escuela de Mam-
li.

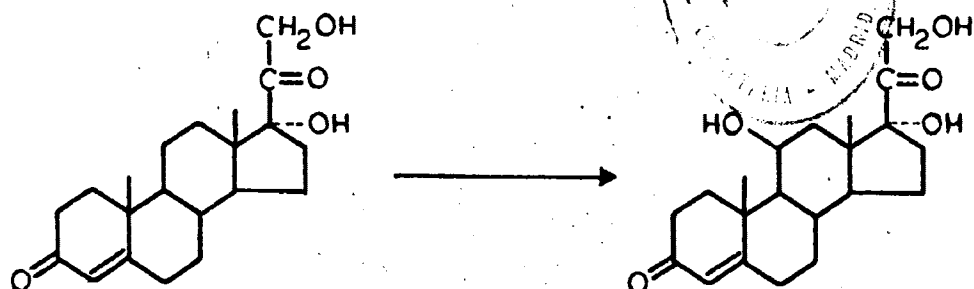
I.1.1. Primeras hidroxilaciones.

En 1950, Peterson y Murray observaron la prime-
ra 11-hidroxilación por microorganismos, concretamente la
11 α -hidroxilación de la progesterona por el hongo *Rhizo-*
pus arrhizus. Poco después se comprobó que el *Rhizopus ni-*
gricans producía, con un gran rendimiento, esta misma hi-
droxilación.

La importancia del descubrimiento de estos auto-
res puede decirse el hecho de que abrió unas nuevas pers-
pectivas en la tecnología de la producción de estas hor-
monas adrenocorticales y, eventualmente, en sus análogos
sintéticos. Se introdujo el empleo de hongos, todavía in-
explorados como fuente de enzimas, en las transformacio-
nes microbiológicas.

Colingsworth, Brunner y Haines, en 1952, tam -

bien pertenecientes al equipo de la compañía Upjohn, descubrieron la 11 β -hidroxilación del Compuesto S con el actinomiceto *Streptomyces fradiae*. Esta fue el prototipo de una segunda clase de Hidroxilaciones de considerable importancia comercial.



También se interesaron por estos trabajos Perlman, Titus y Fried de Squibb. Independientemente descubrieron la 16 α -hidroxilación de la progesterona con un actinomiceto *streptomyces argenteclaus*. Cuando fue descrita la actividad antiinflamatoria de la triamcinolona por Bernstein en 1956, se comprobó la importancia considerable que tenía este descubrimiento. (Bernstein, 1956, Thoma y col., 1957). Fried y sus colaboradores también habían descubierto en sus primeros trabajos la 11 α -hidroxilación por el *Aspergillus niger*.

I.1.2. Primeras deshidrogenaciones.

Uno de los primeros trabajos efectuados por Noble fue el tratamiento del diacetato de cortisona con *Corynebacterium simplex*, quizá intentando repetir la expe -

riencia de Mamoli con *Corynebacterium mediolanum*, quién había demostrado la presencia de una esterasa, pero el producto obtenido, no fue hidrocortisona. Comprobada la acción de este microorganismo con otros sustratos, se comprobó que efectuaba una deshidrogenación en 1 como actividad fundamental con la Sustancia A. Herzog, 1962, Nobile, 1955 . Fig. I.1.a.

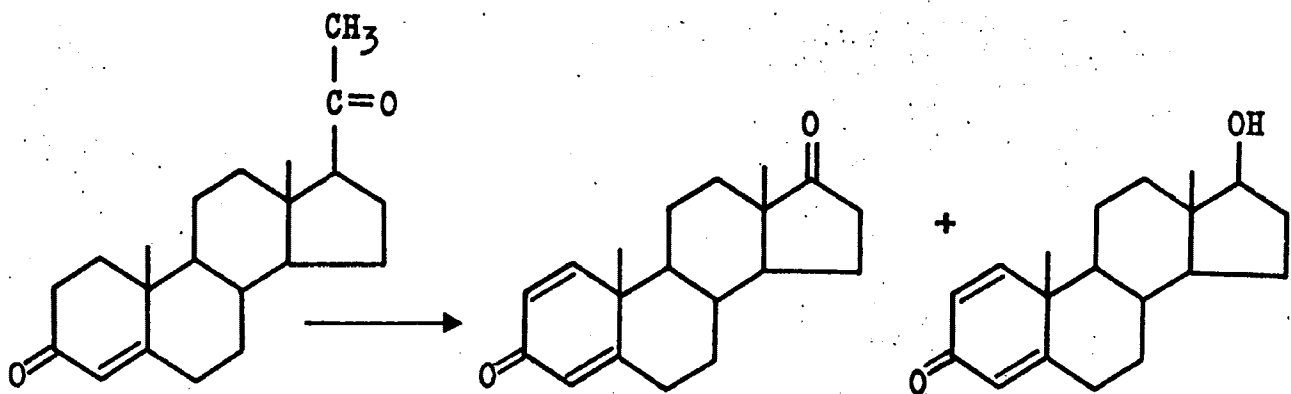
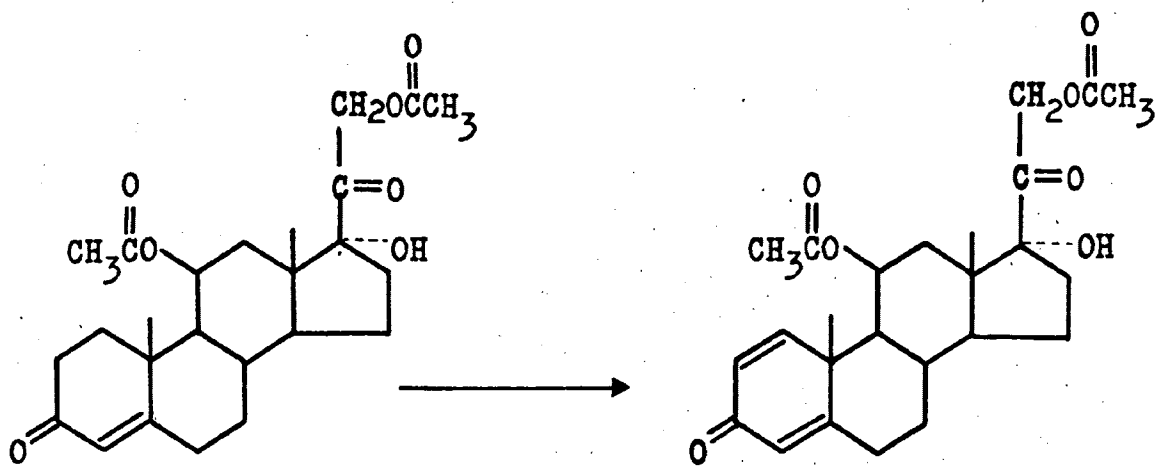
La reacción microbiana de deshidrogenación en 1 no era nueva, ya que había sido descrita por Fried en 1953. Vischer y Wettstein también habían observado esta deshidrogenación Vischer, 1953., pero con una degradación simultánea de la cadena lateral, por lo que el descubrimiento de la posibilidad de deshidrogenación en 1 sin alterar la cadena lateral, sí fue un paso importante en la preparación de análogos de la cortisona e hidrocortisona, que llevaron a la prednisona y prednisolona, respectivamente, que se revelaron más potentes farmacológicamente en el tratamiento de la artritis reumatoide. Fig. I.1.b.

Usando técnicas de fermentación, la Schering Corporation, comenzó la fabricación de prednisona y prednisolona desde 1955.

Otros investigadores continuaron este camino,

Fig.I.1.a.-Deshidrogenación en 1 de la Sustancia S de Reichstein por *Arthrobacter simplex*

Fig.I.1.b.-Deshidrogenación en 1 descrita por Fried en 1.953, mediante *S.lavandulae*



hacia la obtención, mediante el empleo de microorganismos, de derivados de las hormonas adrenocorticales. La triamcinolona, cuya preparación y propiedades fueron descritas por Bernstein y sus colaboradores del equipo de investigación de Lederle en 1956, fue el primer agente antiinflamatorio en cuya estructura había un átomo de Flúor en la posición 9, descubierto por Fried y Sabo en 1954. No obstante, no era lo suficientemente potente la actividad de retención de sales, por la presencia del halógeno, así como la insaturación en la posición 1. Bernstein pensó que la presencia del grupo hidroxilo en 16, bloqueaba la retención de sales, por lo que introdujo, químicamente, este grupo en sus primeras experiencias. Perlman, Titus y Fried, así como Thoma y Fried, introdujeron las técnicas microbiológicas para la formación de este grupo con lo que, actualmente, se emplea la 9 α -fluorocinolona, mediante la técnica de Fried y Sabo, con la hidroxilación en 16 mediante el empleo de microorganismos.

I.1.3. Obtención de corticosteroides naturales o sintéticos.

Actualmente, muchos corticosteroides son obtenidos mediante el empleo de microorganismos en alguna

parte del proceso industrial. Así la parametasona y la fluocinolona requieren la introducción de un hidróxilo en 11 mediante el empleo de microorganismos. La dexametasona y la betametasona se obtienen, con el concurso, técnicas microbiológicas, a partir del ácido desoxicólico y de la hecogenina.

Los microorganismos tuvieron un importante papel en el descubrimiento de la 1 -dehidrometiltestona, importante agente anabólico. Fue preparada, en primer lugar, por Nobile mediante el empleo de *Corynebacterium simplex* a partir de la metiltestoterona, e, independientemente, por Vischer, Meystre y Wettstein (1955).

I.1.4. Nuevas perspectivas en este campo.

Un impulso notable en este campo de aplicaciones fue dado por Sih y sus colaboradores, en el curso de sus investigaciones sobre la degradación microbiológica de esteroides. Sih observó que la estrona y el estradiol eran resistentes al ataque de *Nocardia restrictus*, aunque este hongo era capaz de utilizar el colesterol como única fuente de carbono (1965). Pensó que la actividad podía estar dirigida hacia la degradación de la cadena lateral convirtiendo al colesterol

en un 17 cetoesteroide, seguida por una aromatización del anillo A, dando lugar a la formación de estrona. En los primeros trabajos publicados (1965), Sih y Wang, obtenían un rendimiento del 8% de estrona por la acción de *N. restrictus*. Fig. 1.2.a.

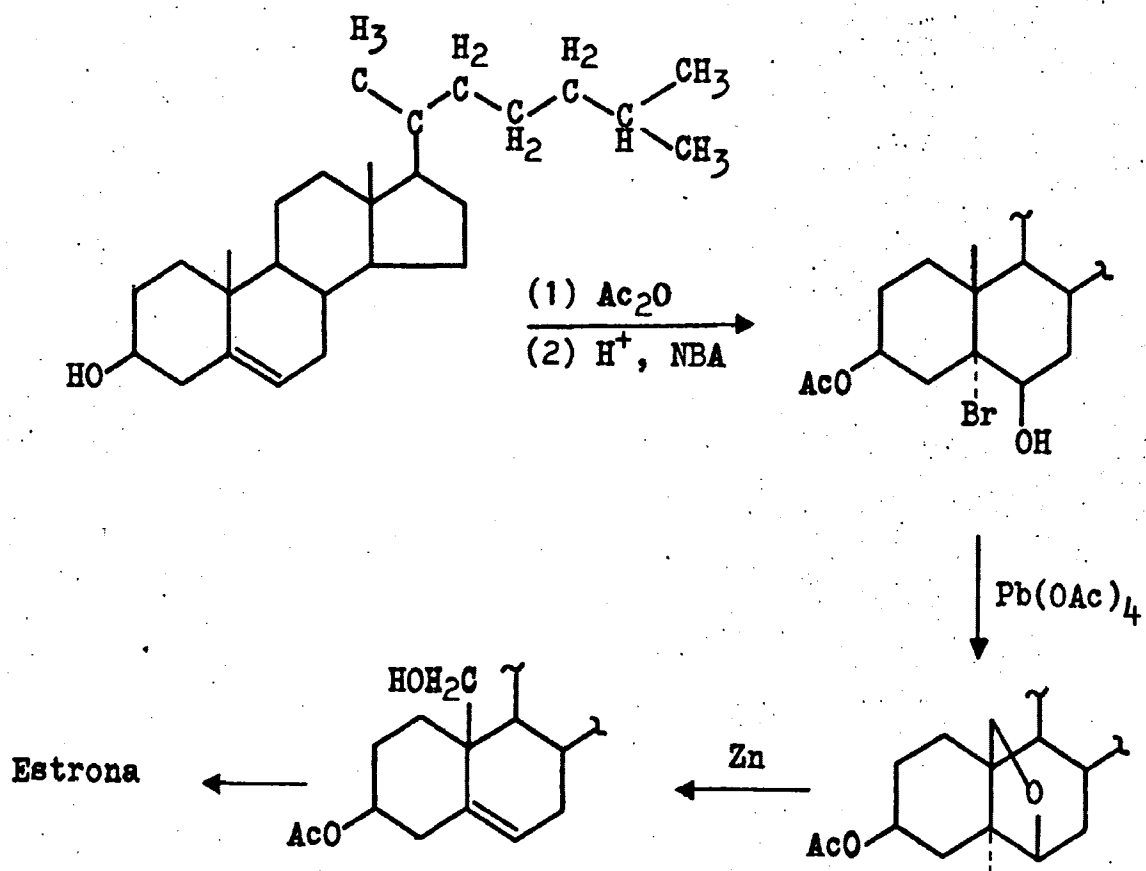
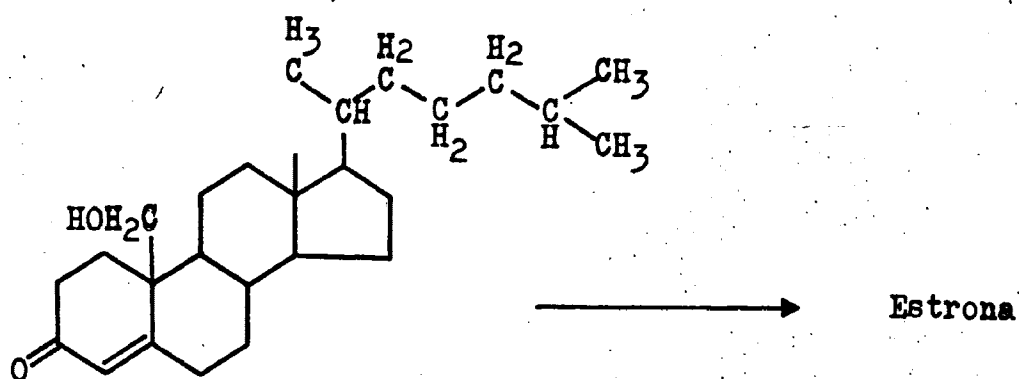
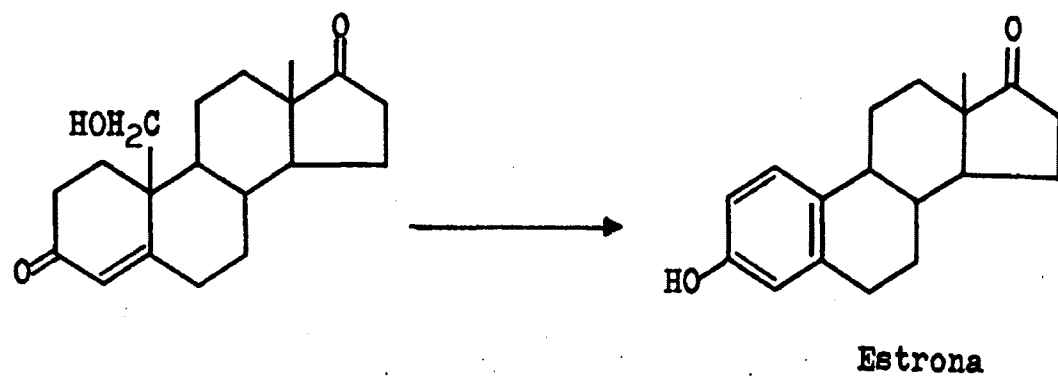
En experiencias posteriores, cambiando el sustrato 19-hidroxicolesterol, 3-acetato, y de cepa, llegaron a obtener un rendimiento del 72%. Fig. 1.2.b.

Posteriormente, Sih y muchos otros investigadores, han demostrado que numerosas especies microbianas, v. gr., *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Proactinomyces*, etc., son capaces de utilizar el colesterol como única fuente de carbono. Es razonable pensar que muchas especies de estos géneros pueden ser utilizados en el futuro en la obtención de estrona. Sih también demostró que análogos estructurales del colesterol como el β -sitosterol, pueden actuar como fuentes de carbono para *Nocardia*. Por analogía con el caso del colesterol, el 19-hidroxi 4- estigmasterol podría ser usado en la preparación de estrona. La importancia de este hecho reside en que su obtención, a partir de plantas, es mucho más económicas que el colesterol, con lo que se abarataría grandemente la preparación de estrona.

En resumen, la microbiología aplicada en la

Fig.I.2.a.-Obtención de la estrona a partir de
19-hidroxi 4-colesten-3-ona.

Fig.I.2.b.-Obtención de la estrona a partir de
3 acetato de 19 hidroxil colesterol.



química de los esteroides ha resultado ser una contribución de primera importancia en la tecnología, en la Medicina y en la Ciencia. Los pioneros de esta vía, Murray, Peterson, Perlman, Fried, dieron las bases para la aplicación de los microorganismos en la síntesis de esteroides de aplicación médica. Los estudios sobre la dinámica de estas síntesis, han aclarado un sin número de aspectos de la química enzimática.

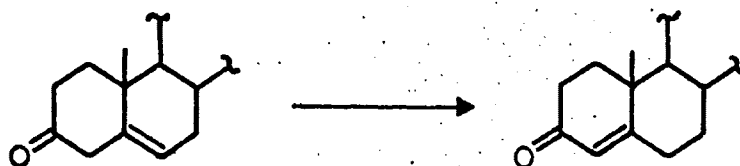
I.2. El papel de las enzimas en las transformaciones microbianas.

Las transformaciones microbiológicas de esteroides son una parte de una gran cantidad de reacciones de química orgánica catalizadas por enzimas. La función de los microorganismos es proporcionar una fuente inagotable de las enzimas requeridas y, en algunos casos, proporcionar cofactores que actúan específicamente sobre los esteroides en presencia de las enzimas, o contribuyen a la regeneración de la parte activa de la enzima. El papel de las enzimas en estas reacciones ha sido probado, en varios casos, por el aislamiento de las enzimas cristalizadas de las cepas microbianas y por la acción "in vitro" sobre los esteroides de estos extractos

enzimáticos purificados. La transformación obtenida mediante la acción del cultivo de microorganismos.

Hubener y colaboradores, 1960, aislaron la 20 β -hidroxi esteroide deshidrogenasa a partir de *Streptomyces hydrogenans*, que, incubándolo en presencia de diversos 20-cetoesteroides, daba lugar al correspondiente 20 β -hidroxi compuesto con rendimiento importante.

Otra enzima que ha sido estudiada cristalizada es la isomerasa de Kawara, y Wang (1960); Talalay, 1962, una enzima inducida del *Pseudomona testoteroni*. En este caso, Malhotra y Ringold, 1965, han demostrado, que la reacción:



era intracelular y que no se requerían más reactivos o cofactores.

Un ejemplo interesante de reacción endógena, fue descrita por Gale y colaboradores, 1962, quienes demostraron que la vitamina K2 puede ser aislada a partir del *Bacillus sphaericus*. Estos investigadores encontraron que, en extractos libres de celular, en el sistema

deshidrogenante en 1 procedente del *Bacillus sphaericus* utilizadaba como cofactor la vitamina K₂. Sin embargo, Talalay, 1965, considera que el papel de la vitamina es de aceptor secundario de hidrógeno actuando como aceptor primario una flavina.

La generación de las formas oxidadas de las coenzimas o reactivos del NAD, flavina o vitamina K depende, en última instancia, de oxígeno del aire. Para que tenga lugar una transformación eficiente, el oxígeno debe tener un contacto íntimo con el material celular para que pueda penetrar por difusión, al interior de las células. La solubilidad del oxígeno en medio acuoso es limitada, por lo que se requiere, con frecuencia, una aireación o agitación que mantenga la saturación en oxígeno del medio líquido. La agitación de los matraces de cultivo no suele ser lo más apropiado, sino una agitación mediante la entrada, burbujante, del aire en el interior de los frascos de cultivo.

En resumen, el microorganismo puede ser elegido en razón de las enzimas o cofactores que aporte. En este caso, solamente es necesario cultivarlo en un medio de cultivo apropiado en que tenga un buen crecimiento y en el que pueda secretar las enzimas y cofactores necesa

rios, en cantidades convenientes y que puede ser testado con el esteroide en cuestión. El conocimiento de la naturaleza enzimática de estas reacciones nos indica que hemos de elegir las condiciones exactamente adecuadas de pH, temperatura, etc., que condicionen este tipo de reacciones. Este óptimo, en cuanto a las condiciones, no siempre coincide con el de las reacciones enzimáticas, ya que está condicionado por la curva de crecimiento de los microorganismos empleados.

En algunos casos se ha comprobado que la producción de enzimas está condicionada por la presencia de esteroides, por ser estas inducidas por su presencia, o de otros inductores, como comprobaron Murray y Sebek, 1959, y Koespsell, 1962, en el caso de *Septomyxa affinis*, que producía su 1-deshidrogenasa en presencia de 3-cetobisnor-4-colen-22-al.

Otros microorganismos son cultivados en un medio libre de esteroides, se filtra y se separa la parte celular, luego se resuspende el material celular en agua a la cual se añade el esteroide posteriormente. En este caso no hay inducción enzimática. La transformación que se obtiene con estas células, parece ser el resultado de las enzimas sintetizadas en un período de crecimiento temprano, anterior a la adición de esteroides.

Muchos microorganismos producen una gran varie
dad de enzimas que condicionan diversas acciones trans -
formantes sobre los esteroides, por lo que es necesario,
en algunos casos, inhibir algunas de ellas, cuando condi
cionan transformaciones no deseadas. Dulaney, Stapley y
Hlavac, 1955, encontraron que la 6 β -hidroxilasa del As-
pergillus ochraceus requiere zinc para su formación. Cul-
tivando este microorganismo en ausencia o con niveles ba
jos de este ión, conseguiremos inhibir la formación de
esta enzima sin dañar la producción de su 11 β -hidroxila-
sa. Condicionamientos de este tipo han sido demostrados
para variados sistemas enzimáticos.

Con lo que hasta el momento conocemos sobre es-
te tema, parece que las transformaciones de esteroides ,
producidas en contacto con las células microbianas intac
tas, tienen lugar en su interior y no en el medio de cul-
tivo que la rodea. Parece ser que la célula microbiana ,
disuelve algo del esteroide y lo incorpora a su interior
donde tiene lugar el contacto con un ambiente extraordina
riamente rico en sistemas enzimáticos. Las implicaciones
prácticas que esto lleva consigo es que el coeficiente
de solubilidad y su difusión pueden llegar a ser facto -
res limitantes de estas transformaciones. Por ello, la

adición de esteroides tiene que ser mediante el uso de solventes miscibles con el agua y que llevan el sustrato en forma micronizada a la célula microbiana, para que esta pueda incorporarlo.

I.2.1. Especificidad de las enzimas en las transformaciones microbianas de esteroides.

Otra consecuencia, de lo conocido hasta el momento sobre este tema, es que lá acción de estas enzimas no es muy específica sobre el sustrato añadido, lo que ex-plica que muy diversas formas microbianas actúen sobre sustratos muy diferentes, produciendo transformaciones análogas, o bien que actúen diferentes bacterias sobre el mismo sustrato, con productos finales análogos, lo que nos indica que tampoco hay una gran especificidad en cuanto a las especies microbianas por un sustrato determinado. Así podemos ver cómo la Sustancia S de Reichs - tein es atacada por el *Arthrobacter simplex* ATCC 6946, Sutter y col., 1957, por *Bacillus sphaericus* ATCC 7050, Stoudt y col., 1955, por *Pseudomonas decunhae* ATCC 13261, recogiendo las revisiones de Iizuka y Naito, 1967 y Char - ney y Herzog, 1967, hasta un total de 23 especies dife - rentes, que llevan a cabo análoga transformación.

De la misma forma, la cortisona puede ser ata-

cada por un número elevado también de especies bacterianas y fungáceas, que producen la misma transformación, la aparición de un doble enlace nuevo en la posición 1, recogiendo en su revisión, Iizuka y Naito, 1967, y Charney y Harzog, 1967, hasta un total de 15 especies.

Igualmente, y siguiendo las mismas revisiones citadas anteriormente de Iizuka y Naito y de Charney y Herzog, nos encontramos con que el cortisol es atacado por un total de 22 especies microbianas distintas produciendo idéntica transformación.

Estos ejemplos son algunos de los más demostrativos de la inespecificidad de especie en lo relacionado con la transformación microbiana de los esteroides.

Un aspecto que no hemos visto reflejado en ninguno de los trabajos consultados, es si las enzimas que intervienen en la transformación de los esteroides, corresponden a formas moleculares idénticas o si estas formas son diferentes. Así hemos visto trabajos, como los de Neesemann y col., 1960, Schmidt-Thomé y col., 1962, en que aíslan una 20 α -hidroxi-esteroide deshidrogenasa, a partir de Streptomyces hydrogenans, realizan su estudio exhaustivo, la dinámica de su producción según los grupos funcionales del sustrato, pero no hacen comparacio

nes con otras especies microbianas que posean esta misma actividad, como *Rhodotorula longissima*, cepa Shering OFU N° 2, que actúa sobre la progesterona reduciendo el grupo ceto en 20 a un grupo OH, Chang e Idler, 1961, o.v., gr., con el *Arthrobacter simplex*, que actúa sobre la Sustancia S de Reichstein con esta misma actividad, Sutter y col., 1957, entre otros muchos ejemplos. Es decir que no estudian la identidad entre las enzimas encontradas en diferentes cepas microbianas, con la misma actividad transformante, si pertenecen a la misma forma molecular o si ésta es diferente en alguna de las correspondientes especies.

Por otro lado, hemos visto trabajos, como los de Penasse y Peyre, 1968, Penasse y Baulieu, 1968, en que obtienen una enzima transformante, la 3-Oxo-esteroide Δ^1 -Oxido reductasa, a partir del *Arthrobacter simplex* y la comparan con las obtenidas a partir de otras especies microbianas, como *Pseudomonas testoteroni*, *Nocardia restrictus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cyclooxidans*, encontrando diferencias significativas entre ellas, principalmente dentro de la inhibición de su producción por algunos grupos funcionales de los sustratos empleados.

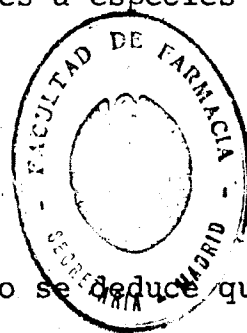
Estos resultados obtenidos por diversos investigadores nos llevan a pensar que puedan haber diferencias significativas entre enzimas microbianas, con la misma acción transformante, pero pertenecientes a especies diferentes.

I.3. Objetivos.

De lo anteriormente expuesto se deduce que:

1.- Este tema ha despertado un gran interés, no sólo desde el punto de vista comercial, ya que permite la obtención de diversos preparados farmacológicamente activos, en condiciones óptimas, bien porque permite la producción de compuestos hormonales en condiciones económicamente inmejorables, o por la aparición de preparados sintéticos, que, solamente por esta vía, pueden ser obtenidos por poseer grupos funcionales inatacables con las técnicas de la química orgánica clásica, acción selectiva de un microorganismo sobre algún punto determinado de la molécula del esteroide en cuestión, etc.

Por otro lado, desde un punto de vista teórico, permite aclarar mecanismos de síntesis y de transformaciones de estos compuestos. Todo ello ha llevado ha



llevado a la investigación masiva de estos procesos, lo que se deduce de la inmensa bibliografía existente sobre estos temas, de que muchos de ellos estén protegidos por patentes, la creación de grandes complejos de investigación y producción, principalmente por las grandes compañías farmacéuticas, así como institutos de investigación aplicada, como el dirigido por H. Iizuka en la Universidad de Tokio.

2.- La transformación no es específica de una bacteria determinada, sino que puede ser llevada a cabo por especies muy diferentes unas de otras, por lo que no hay especificidad en cuanto a las especies microbianas que intervienen en ellas.

3.- No hay evidencia de que la transformación sea llevada a cabo por enzimas con la misma función pero con estructuras moleculares idénticas o diferentes. Precisamente este ha sido el objetivo general de esta Tesis llevar a cabo un estudio del proceso de transformación, mediante el análisis antigénico con el fin de determinar si la misma transformación es llevada a cabo por enzimas con la misma función, pero con estructuras moleculares diferentes.

Para ello el trabajo se planteó de la siguiente

te manera:

En primer lugar, la elección de un sustrato su
ficientemente estudiado, para que no pudiere darse el ca
so de introducir elementos mal conocidos dentro de él, si
no que todos los pasos estuviesen completamente controla
dos durante todo el proceso de transformación.

Por esta razón elegimos, como sustrato, la Sus
tancia S de Reichstein, una de las mejor estudiadas en
este aspecto, especialmente por Stoudt y col., 1955, fren
te al Arthrobacter simplex ATCC 6946 y frente al Bacillus
sphaericus ATCC 7055, por Sutter y col., 1957, entre o
tros muchos investigadores.

De aquí se deduce que eligiéramos como bacte
rias a estudiar, las cepas anteriormente mencionadas, Ba
cillus sphaericus ATCC 7055 y Artherobacter simplex ATCC
6946, pero que, también, estuviesen lo suficientemente
separadas taxonómicamente entre sí, para que la posible
comunidad enzimática que pudiese existir no fuese atri
buble a similitudes entre especies afines.

Por otro lado, y mediante la acción de Naranja
de Acridina, utilizada en adición a los medios de culti
vo, en condiciones limitantes de crecimiento, obtuvimos
unas mutantes para ambas especies bacterianas, sobre las

que trabajamos en paralelo, con el objeto de estudiar qué posible acción sobre la transformación encontrábamos. Por otro lado, mediante la presencia de esta sustancia, excluimos la posibilidad de interferencia por cualquier factor extranuclear, episomas, que pudiesen explicar la posible identidad enzimática entre ambas especies.

Para el revelado de la presencia de estos sistemas enzimáticos, acudimos a la utilización de técnicas inmunológicas, teniendo en cuenta que, por su composición protéica, estos sistemas enzimáticos son antigénicos y detectables, por tanto, mediante estas técnicas. Con ellas pretendemos, por un lado, detectar la composición antigénica total de ambas bacterias y, dentro de ella, cuáles componentes son constitutivos de raza, cuáles inducidos por la presencia del sustrato esteroide, cuáles reprimidos, así como la evidenciación de la posible comunidad antigénica entre ambas bacterias, que correspondería a componentes enzimáticos iguales en cuanto a su forma molecular, dada la exquisita sensibilidad de estas técnicas inmunológicas.

Este tipo de estudio no hemos encontrado descrito que se haya utilizado en este campo de la transformación microbiológica de esteroides, por lo que creemos que presentamos una aportación interesante a este campo.

de investigación, aunque sí se hayan utilizado para el estudio de otros sistemas enzimáticos, su dinámica y las interrelaciones en forma de activación de las enzimas por la presencia de anticuerpos, tales como los trabajos realizados por Cinader, 1963, Cinader y Rafferty, 1964, Cinader y col., 1971, Suzuki y col., 1969, Pelichova y col., 1970, Avrameas, 1970, Vogel, 1967, etc.

Para la realización de estos estudios hemos acudido a la inmunización de conejos mediante los extractos antigénicos obtenidos a partir de los cultivos bacterianos, antes y después de la adición del sustrato según describimos en los apartados correspondientes.

En nuestra exposición prescindiremos, en gran parte, de los datos químicos de estudio de los esteroides. Solamente incluiremos, tanto en la parte de Material y Métodos, como en los Resultados, aquellos datos que nos sean necesarios para la comprobación de la positividad de la transformación del sustrato.

Una vez obtenidos los resultados, los expresaremos en forma de bandas de precipitación en las inmunolectroforesis realizadas en los distintos sistemas ensayados, procediendo con ellos a la construcción de unas tablas resumen de los datos obtenidos y que nos darán los compo -

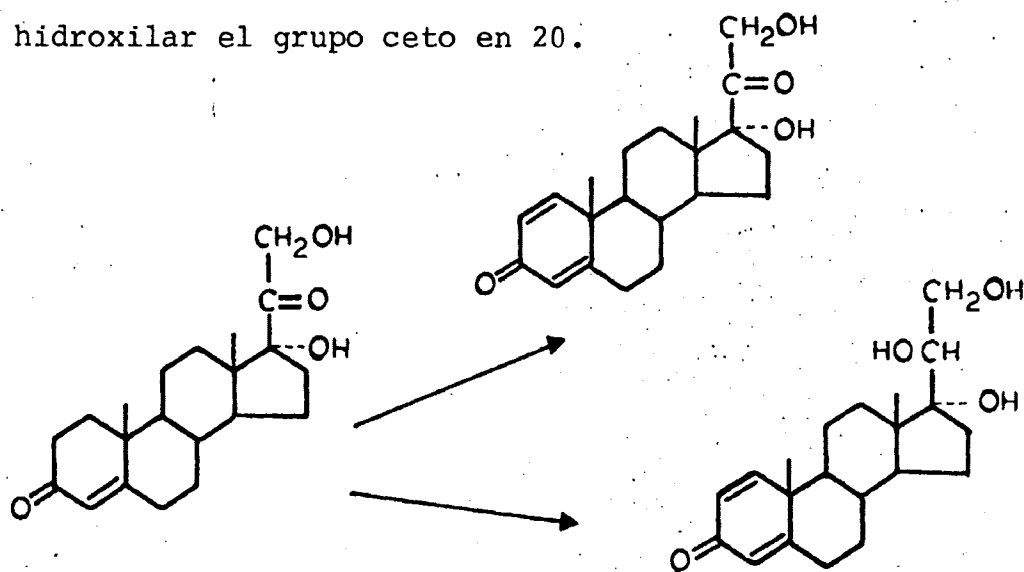
nentes enzimáticos constitutivos, inducidos y reprimidos,
así como la comunidad antigénica existente entre ambos
sistemas bacterianos.

II. MATERIAL Y METODOS.

II.1. Cultivo de microorganismos.

II.1.2. Microorganismos utilizados.

Para nuestro estudio elegimos dos especies bacterianas, plenamente conocidas en su actividad transformante, especialmente sobre el sustrato elegido, la Sustancia S de Reichstein, Stoudt, et al. 1955 ; Sutter et al. 1957 , que fueron el *Bacillus sphaericus*, ATCC 7050 y el *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946. Que poseen, además, una actividad parecida, con una especie de gradación de acciones, Iizuka y Naito 1967 , en que ambos atacan el anillo A, pero llevando su actividad un poco más lejos el *Arthrobacter*, al hidroxilar el grupo ceto en 20.



Estos microorganismos tienen las siguientes características:

Bacillus sphaericus, ATCC 7050, Neide. Denominado anteriormente *B. fusiformis*, perteneciente a la familia

Bacillaceae, que son bacilos Gram positivos, esporulados, con esporas terminales o subterminales, que no deforman el soma bacteriano. Móvil por flagelos peritricos, Aerobio, catalasa positivo. Con una temperatura óptima de cultivo de 28 a 35° C. Que tolera un 4% de sal en sus cultivos. Que crece bien sobre medios de cultivo ordinarios. Procedente del suelo.

Corynebacterium o Arthrobacter simplex, ATCC 6946, Microorganismo de clasificación incierta, en que se ha ido cambiando su colocación dentro de los grupos bacterianos a medida que se iban conociendo más detalles de su comportamiento y características fisiológicas. El Género Arthrobacter fue creado por Conn y Dimmick en 1947, siguiendo a Fischer, 1895, para agrupar un gran número de especies de colocación incierta. Concretamente, la especie utilizada, ha recibido los nombres de Corynebacterium simplex, Jensen 1934, Mycobacterium flavum, Krasil'nikov, 1949 y, por último, Arthrobacter simplex, Jensen, Lochhead, en Bergey et. al., 1957. Procede del suelo. Se cultiva fácilmente sobre medios de cultivo ordinarios. Prevot, 1961, lo sigue incluyendo en el Género Corynebacterium.

Otras características conocidas de esta especie bacteriana, es su aerobiosis, pleomórficos en cultivos jóvenes, presentándose algunas veces con filamentos.

En cultivos viejos adquieren forma cocoide. Utilizan nitrógeno inorgánico. Aunque se admite la división del género *Corynebacterium*, no están muy bien delimitadas las diferencias, Zagallo y Wang, 1962.

Mulder en 1964, expuso su carácter de Gram variables y sus requerimientos nutritivos. Morfológicamente es similar a los géneros *Brevibacterium*, *Celulomonas*, y *Mycobacterium*.

Otro carácter que ayuda a su clasificación es la composición de la pared bacteriana, Cummins, 1962, así como las reacciones serológicas.

Revira y Brisbane, en su revisión de la taxonomía numérica de bacterias del suelo, recogido en el Symposium sobre Ecology of Soil Bacteria, 1968, describen hasta 37 tests de clasificación del género *Arthrobacter*, siendo la revisión más exhaustiva que hemos encontrado sobre el tema.

Posteriormente, Skiring, G.W. y Qadling, C., 1970, describen, siguiendo la taxonomía numérica, según el índice Guanina-Citosina, hasta 77 especies pertenecientes al grupo *arthrobacter-coryneformes*.

II.1.2. Cultivos de los microorganismos.

Los medios de cultivo empleados fueron, para el *Arthrobacter simplex*, y siguiendo a Herzog, H.L. et al., 1962, los siguientes.

- Yeast extract (Difco) 3,0 g.
- $\text{PO}_4 \text{ H}_2 \text{ K}$ 4,49 g.
- $\text{PO}_4 \text{ HNa}_2,7 \text{ H}_2\text{O}$ 8,83 g.
- Agua del grifo, c.s.p. 1 L.

En este medio de cultivo se siembra un asa de platino de material celular, procedente del crecimiento de *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946, sobre un medio compuesto por un 1% de yeast extract-dextrose agar incubando la siembra durante 18 a 24 horas. 1 ml. de cultivo resultante, se considera como inóculo estandar, para el medio de cultivo en que vamos a realizar la transformación de esteroides.

El medio para la transformación de esteroides, está compuesto por 1 g. de yeast extract (Difco), en un litro de agua del grifo, cuyo pH se ajusta a 6,8-7,0, distribuyéndolo en matraces de 250 ml. en cantidades de 100 ml. por matraz, a los cuales se les añade el inóculo estandar.

Se procesa a la incubación a 30° C., en un agi-

tador orbital, a unos 150 r.p.m., siguiendo el crecimiento por turbidimetría, hasta llegar a un crecimiento máximo, cuando alcanzamos el pico de la fase logarítmica de crecimiento.

Para el *Bacillus sphaericus*, ATCC 7055, el medio de cultivo empleado fue, siguiendo a Stefanovic, V., 1963, el siguiente:

- Yeast Extract (Difco) 3,0 g.
- N-Z-Case (Peptona Difco) 5,0 g.
- Agua del grifo, c.s.p. 1 L.

A partir de la reconstitución de la cepa de la colección, en Agar Nutritivo, cultivado a 30° C., tomamos un asa de material celular, que consideramos inóculo estandar después de 24 horas de incubación.

El medio de cultivo se repartió en Erlenmeyer de 250 ml., en cantidades de 100 ml. por cada Erlenmeyer que se inoculó con el inóculo estandar, incubándolo a 30° C., en un agitador orbital, con 150 r.p.m., durante 18 a 24 horas, siguiendo turbidimétricamente el crecimiento, hasta obtener un crecimiento máximo, pico de la fase logarítmica de crecimiento.

Una vez obtenido el crecimiento máximo para cada bacteria, procedíamos a separarlas, según el destino

apropiados a cada fase de nuestro trabajo, preparando, si multáneamente, siete series de cultivos.

Las primeras dos series estaban destinadas a la preparación de antígenos, una para inmunizar y otra para analizar. La tercera serie la destinamos a la adición del sustrato esteroide, es decir, para la transformación de este sustrato. Las otras tres las destinamos a la adición de Naranja de Acridina, según describimos posteriormente.

La preparación de antígenos, tanto para analizar como para inmunizar, la describimos en el apartado II. 2.

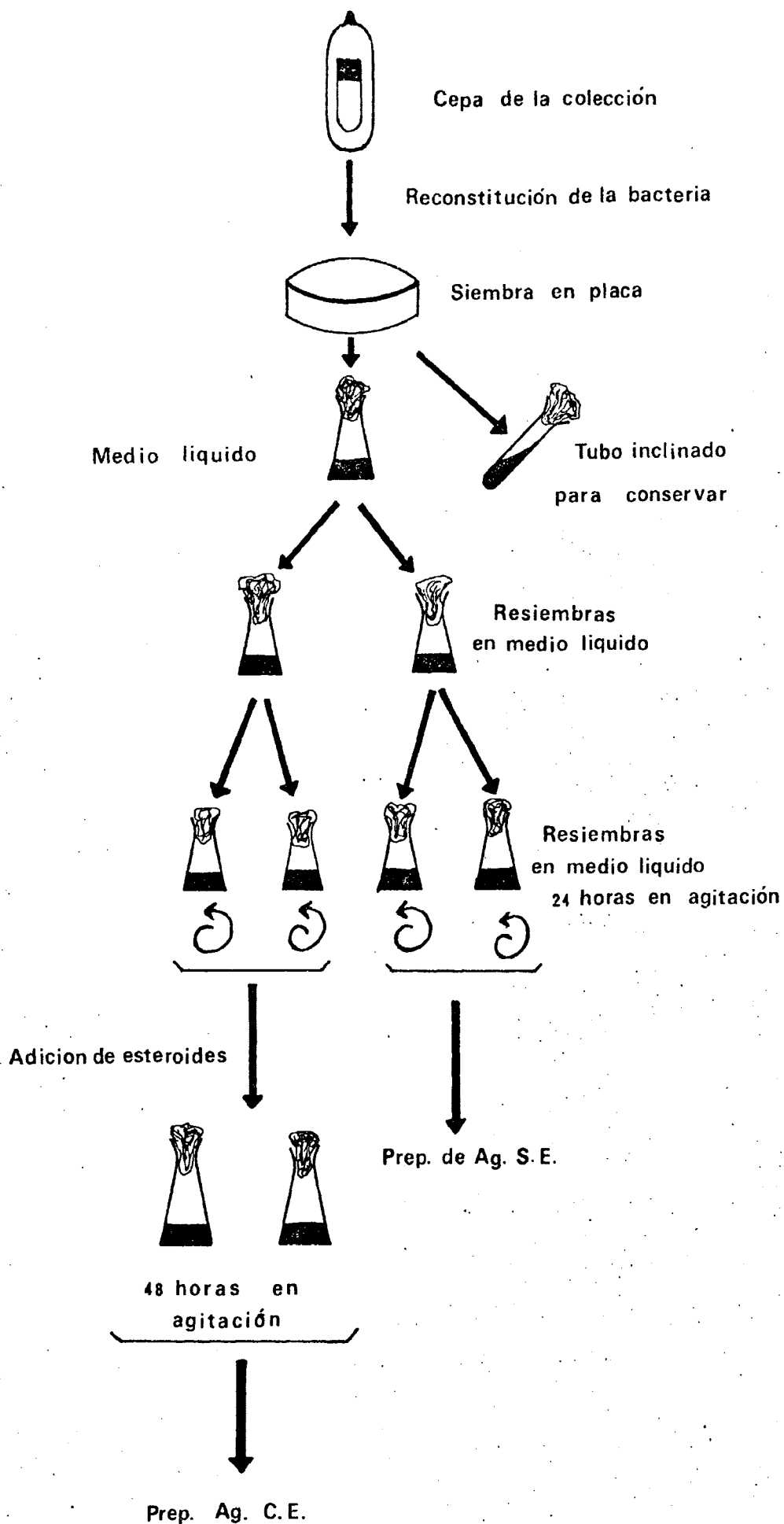
La adición del sustrato esteroide la describimos en el apartado II.1.4.

La preparación de los cultivos con Naranja de Acridina, la describimos en el apartado II.1.3.

II.1.3. Cultivo de los microorganismos con Naranja de Acridina.

La preparación de estos medios de cultivo, fue en todo igual a los medios de cultivo normales, solamente hemos de destacar que, según apuntamos más adelante en la Discusión, añadimos Naranja de Acridina a los mencionados medios de cultivo, en una concentración idónea para no im

Fig.II.1.-Esquema de la preparación de los cultivos bacterianos con su destino final.



pedir el crecimiento máximo de los microorganismos, con -
centración que encontramos era de 10 microgramos por ml.

La adición de esta sustancia ~~la~~ hacíamos al pre-
parar estos medios, llevando al autoclave el medio comple-
to, adicionado ya con esta sustancia.

A partir de aquí, continuamos la ~~metódica~~ metódica nor-
mal de estos cultivos, incubación a 30° C., agitación or-
bital a 150 r.p.m. y mantenimiento del cultivo previo de
18 a 24 horas, antes de proceder a la fase siguiente, que,
en este tipo de cultivos, consistía, por un lado, en la
preparación de antígenos para analizar y comparar con los
obtenidos en los cultivos normales, y, por otro, en la adi-
ción del sustrato esteroide, para investigar la actividad
transformante de estas cepas con la presencia de Naranja
de Acridina.

II.1.4. Adición del sustrato esteroide.

Una vez comprobado que se había llegado a la fa-
se de crecimiento máximo, procedimos a la adición del
sustrato esteroide, en aquellos sistemas destinados al es-
tudio de la transformación, tanto en los cultivos que con-
sideramos normales, como a aquellos a los que añadimos Na-
ranja de acridina.

Esta adición se realizó, en cantidades de 50 mg. del sustrato por Erlenmeyer con 100 ml. de medio, di solviendo, en caliente, en 2 ml. de metanol, cantidad que comprobamos no afectaba en nada el comportamiento posterior de las bacterias.

Una vez realizada esta operación, continuamos la incubación de las bacterias en las mismas condiciones de cultivo, manteniendo la reacción durante 96 horas.

Pasado este tiempo de incubación, procedimos a la extracción de los componentes orgánicos, mediante ace tato de etilo, según describimos en el apartado II.6.2..

II.2. Preparados antigénicos.

A partir de los cultivos bacterianos se procede a la preparación de los correspondientes sistemas an tigénicos. Teniendo en cuenta su distinta utilización, se según estén destinados a inmunización o análisis, se proce derá a la preparación conveniente para cada caso.

II.2.1. Sobrenadante de los cultivos.

Partiendo del caldo de cultivo, la primera ope ración es separar las células del contenido celular. Para ello se somete a centrifugación aséptica a 4° C. a 6.000 r.p.m., durante 15 minutos. Se recoge el sobrenadante

con pipeta estéril. De este sobrenadante se parte, en los casos de bacterias a las que se les ha añadido esteroides para la extracción de la fracción esteroídica con las técnicas apropiadas al caso, descritas en el apartado II.6.

II.2.2. Células desecadas por acetona.

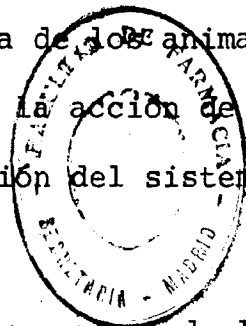
El primer sedimento de células se resuspende en gran cantidad de acetona a -20° C. y se centrifuga de nuevo para lavarlo. Esta operación se repite dos veces más, decantando los sobrenadantes respectivos, que se desechan. Al sedimento final, lo más seco posible, se le añade, como mínimo, tres veces su volumen en acetona a -20° c. Se resuspende el sedimento en ella y se lleva al congelador a -20° C., donde se deja en reposo durante toda la noche. A final de este período se centrifuga de nuevo.

El sedimento, desecado al vacío, se empleará en la confección de los complejos antigénicos.

II.2.3.1 Antígenos para inmunizar:

Una vez desecado al vacío el sedimento obtenido anteriormente, se procede a su pulverización en mortero, hasta conseguir una gran homogeneidad. Se resuspende en solución salina fisiológica estéril, en cantidad suficiente para conseguir una concentración protéica de 20 mg. por ml., expresado en albúmina.

Esta suspensión del polvo antigénico, se mezcla, a partes iguales, con Coadyuvante de Freund, con el fin de lograr una mayor respuesta antigénica de los animales inmunizados. Esta suspensión se somete a la acción de un agitador para conseguir una mejor dispersión del sistema coadyuvante-extracto acuoso.



El Coadyuvante de Freund se prepara de la siguiente manera:

- Aceite mineral 3 volúmenes.
- Lanolina anhidra 1 volumen.

Una vez preparado, se esteriliza en autoclave, durante 30 minutos a 120° C.

Para favorecer, aún más, la mezcla del Coadyuvante con el extracto acuoso, se calienta, en bañomaría a 37° C., la mezcla, con lo que se consigue una buena suspensión.

El antígeno queda así en condiciones de ser empleado en la inmunización de los conejos, con una concentración protéica de 10 mg/ml. Se distribuye en frascos estériles de pequeña capacidad y se conserva en congelador a -20° C.

II.2.2.2 Preparación de antígenos para el análisis antigénico:

A partir del sedimento seco, obtenido en II.2., se parte para la preparación de los antígenos para analizar. Para ello se procede, en primer lugar, a resuspender lo en solución salina estéril, igual que en el apartado anterior. Luego se procede a la ruptura celular, mediante ultrasonación, en un Desintegrador ultrasónico, MSE, de 150 w., a 10 micrones de intensidad y en sesiones de 5 minutos, repetidas tres veces y con un descanso de cinco minutos entre ellas. Se mantiene, durante todo el proceso, sumergida en baño de hielo, para evitar calentamientos que pueden conducir a la inactivación de las enzimas presentes. El resultado se deja en extracción 24 horas, en nevera y se vuelve a ultrasonar en las mismas condiciones. Por último, se procede a centrifugar a 6.000 r.p.m. durante 20 minutos, recogiendo el sobrenadante, que contendrá los componentes intracitoplasmáticos, separándolo de los restos de paredes celulares.

Se procede a la determinación de la concentra - ción protéica de este extracto, mediante el biuret, según describimos posteriormente, II.3.2., después se lleva, mediante diálisis a la concentración más conveniente, para la obtención de bandas de precipitación en la inmuno~~elec~~troforesis, bien diferenciadas por su nitidez e intensidad.

Estos procesos de preparación de antígenos son los mismos en los distintos supuestos, según la cepa bacteriana y la condición de sin y con la adición de esteroides. Con lo que se obtienen los siguientes sistemas antigénicos: *Bacillus sphaericus* sin esteroides, *Bacillus sphaericus* con esteroides, *Arthrobacter simplex* sin esteroides y *Arthrobacter simplex* con esteroides, en dos series, una para inmunizar y otra para analizar. Tal como lo expresamos en el esquema de la Fig. II.2., que se utiliza para ambas cepas bacterianas en ambas condiciones de sin y con adición del sustrato esteroide.

En adelante, para facilitar la expresión de los distintos elementos que intervendrán en nuestro estudio, dado que su repetición será constante, hemos decidido acudir a la ayuda de un código de iniciales que nos eviten repeticiones farragosas, identificándonos, a la vez, sin temor a equivocaciones, cada componente de los que intervienen en nuestro estudio. Así denominaremos a los distintos elementos:

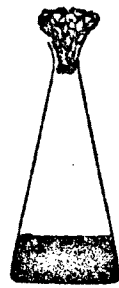
- Antígeno *Bacillus sphaericus* sin esteroides,
B S E.
- Antígeno *Bacillus sphaericus* con esteroides,
B C E.

- Antígeno Arthrobacter simplex sin esteroides,
A S E.
- Antígeno Arthrobacter simplex ^{con} esteroides,
A C E.
- Inmunosuero anti-Bacillus sphaericus sin esteroides, Anti B S E.
- Inmunosuero anti-Bacillus sphaericus con esteroides, Anti B C E.
- Inmunosuero anti-Arthrobacter sin esteroides,
Anti A S E.
- Inmunosuero anti-Arthrobacter con esteroides,
Anti A C E.

Con lo cual esperamos ganar en claridad en nuestra exposición.

La preparación de antígenos la esquematizamos en la figura II.2.

Fig.II.2.-Esquema de la obtención de los extractos
antigénicos con su destino final.



Cultivo bacteriano

Centrifugación



Sedimento

Adición de acetona -20°C
3 veces

Centrifugación



Sedimento

Adición de acetona -20°C
12h. en congelador

Centrifugación



Sedimento

Sol. salina fisiologica

Ag. p. analizar

Ag. p. inmunizar

Ultrasonación



Centrifugación



Sobrenadante



Dialisis



Ag. concentrado

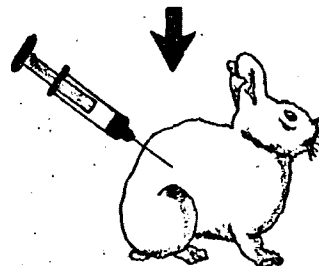


Biuret

Inmunodifusión

I.E.F.

+ Coady. de Freund



II.3. Técnicas auxiliares.

II.3.1. Pervaporación.

Obtención del extracto seco del sedimento bacteriano, mediante desecación al vacío en desecador con cloruro cálcico y con aspiración por bomba de vacío.

II.3.2. Determinación del contenido protéico.

Para conocer la concentración relativa de proteínas solubles en los extractos obtenidos, según las pautas descritas, se utiliza la reacción del Biuret.

A 1 ml. del extracto correspondiente, se añaden 1,5 ml. de reactivo de Biuret. La mezcla se mantiene durante 30 minutos a 37° C. La lectura del espectro de absorción se realiza a 580 nm.

II.3.3. Diálisis.

La excesiva concentración salina de estas muestras, hace imposible la realización de una electroforesis de ellas. Para obviar esta dificultad se realiza una diálisis mediante la utilización de tubos de acetato, en agua destilada, durante 18 horas, a 4° C., con tres cambios de líquido exterior.

II.3.4. Absorción de inmunosueros.

Con el fin de eliminar de los antisueros la presencia de anticuerpos, tanto xenogénicos como comunes, que

interesen eliminar en el control de los considerados como propios de una cepa o sistema determinado, se procede a su absorción según la siguiente pauta: Por cada 0,8 ml. de suero de conejo inmunizado, se añadía 0,2 ml. del antígeno que queríamos eliminar, la mezcla se incubaba a 37° C., durante una hora y se agita intermitentemente. Después de la incubación se deja en nevera 18 horas a 4° C. Transcurrido este tiempo se eliminaba el precipitado que pudiese aparecer en el tubo. Se centrifuga levemente, a una 2.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4° C., considerando el sobrenadante como inmunosuero absorbido, una vez comprobado por inmunodifusión, según la técnica de Ouchterlony, que no daba reacción de precipitación con el antígeno que se había absorbido.

Los sistemas de absorción empleados fueron los siguientes:

1.- 0,8 ml. Anti B S E.

0,2 ml. B C E..

Denominando a este sistema Anti B S E (B C E).

2.- 0,8 ml. Anti B C E.

0,2 ml. B S E.

Cuyo sistema denominamos, Anti B C E (B S E).

3.- 0,8 ml. Anti A S E.

0,2 ml. A C E.

Que denominamos Anti A S E (A C E).

4.- 0,8 ml. Anti A C E.

0,2 ml. A S E

Denominados por nosotros Anti A C E (A S E).

II.4. Inmunosuero.

II.4.1. Pauta de inmunización.

Los animales empleados son conejos machos de 4-6 Kg. de peso. Las administraciones se hacen vía subcutánea en el lomo, avanzando desde atrás hacia adelante, al rededor de 1 cm. cada vez, además de alternar ambos lados de la columna vertebral.

Se comienza por inocular a cada conejo 1 ml. del antígeno correspondiente, tres veces por semana durante las cuatro primeras. Si no es suficiente, se deja descansar 15 días y se administran 2 ml. tres veces por semana, durante las cuatro siguientes. Finalmente, cuando tampoco así se haya alcanzado un buen título, se sigue sin interrupción dos semanas más, en días laborables alternos, inyectando 4 ml.

Los animales que sobrevivan a las sangrías se mantienen a un nivel óptimo de anticuerpo, inyectándoles

durante una semana, cada mes, 4 ml. del antígeno en días alternos (Fig. II.3.).

II.4.2. Sangrías y obtención de sueros.

Como controles de la marcha de la inmunización se hacen tomas de sangre de 10 ml.: a) antes del comienzo de las inyecciones; b) una semana después de la última administración de la primera tanda; c) dos días después de finalizada la segunda tanda; y d) pasada una semana de la última inoculación.

Estas tomas se hacen por cortes de la arteria marginal de la oreja, previa rubefacción con xinol.

La sangre, en tubo estéril, para a estufa a 37° C., durante dos horas y después, a nevera toda la noche. Al día siguiente, después de centrifugar, se retira el suero y se mantiene en el congelador a -20° C.

Cuando queda comprobado que la tase de anti - cuerpos en el inmunosuero es suficiente (véanse técnicas correspondientes en II.4.3.), comienzan las sangrías para obtener suficiente cantidad de suero. Estas son de 40 ml. durante 4 días sucesivos, también de la arteria marginal de la oreja, siempre que resulte posible. Si no lo es en un momento dado, puede hacerse una punción directa

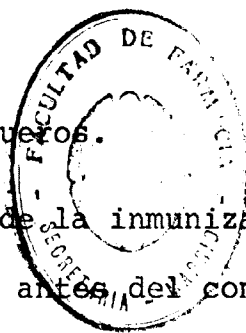


Fig.II.3.-Esquema de la pauta de inmunización
seguida para la obtención de los inmunosueros.

PAUTA DE INMUNIZACION

CONEJO N°

JAULA N°

ANTIGENO:

Fecha	Inoculación	Día N°	Cantidad	Sangría	Tasa Ac.
	N°		Ag.inoc.	N°	
<u>1a serie</u>					
	1	1	1 ml.	1	
	2	3	"		
	3	5	"		
	4	8	"		
	5	10	"		
	6	12	"		
	7	15	"	2	
	8	17	"		
	9	19	"		
	10	22	"		
	11	24	"		
	12	26	"		
	13	29	"		
	14	31	"	3	
	15	33	"	4	
<u>2a. serie</u>					
	16	43	2 ml.	5	
	17	45	"		
	18	47	"		
	19	50	"	6	
	20	52	"		
	21	54	"		
	22	57	"	7	
	23	59	"		
	24	61	"		
	25	64	"	8	
	26	66	"		
	27	68	"		
	28	70	"	9	
	29	73	"		
	30	74	"	10	

al corazón, intentado la máxima recogida posible, con muerte del animal.

En la tabla de la pauta de inmunización (Fig. II.3.), también lleva unas columnas para colocar las cantidades de antígenos inoculadas a cada conejo en volumen, así como los títulos de los anticuerpos recogidos en cada caso.

II.4.3. Titulación.

Cada suero se valora contra su propio antígeno, según el micrométodo de doble difusión en agar de Ouchterlony, ligeramente modificado. Chordi y Kagan, 1964; Chordi y colab., 1962; Tormo y Chordi, 1965.

II.4.3.1. Soporte semisólido.

Esta compuesto por:

Agar Noble Difco.....20 g.
Agua bidestilada.....500 ml.
Tampón veronal, pH 8,6....500 ml.

Por su parte el tampón veronal, pH 8,6, está formado por:

Dietilbarbiturato sódico, Merck..... 9 g.
Acido clorhídrico, 1N.....10 ml.
Azida de sodio.....0,5 g.
Agua bidestilada y desionizada, c.s.p.....1 L.

Su fuerza iónica teórica es de 0'0375.

Una vez totalmente fundido el agar en el agua bidestilada, a bañomaría, se añade el tampón templado y se reparte en tubos 9 ml. por cada uno de ellos. Tapados con Parafilm, se pueden conservar por algún tiempo en nevera a 4° C.

II.4.3.2. Preparación de las placas.

Los portaobjetos, de 2,6 x 7,6 cm., previamente lavados y desengrasados, secos y numerados, se humedecen por una de sus caras con agar fundido y caliente, al 0,1%. Después se secan en estufa. Así se consigue una superficie más rugosa donde luego agarrará mejor la capa soporte del gel de agar.

Para que ésta sea más uniforme en altura (1,5 mm. aproximadamente) es preciso que el porta se encuentre sobre una superficie horizontal. Entonces se vierten sobre él, mediante pipetas, 3 ml. del agar noble fundido y se deja solidificar, después de lo cual es preferible emplearlo directamente y no almacenarlo en cámara húmeda a 4° C., más de unas pocas horas.

II.4.3.3. Disposición de los pocillos.

Todos los pocillos son de 3 mm. de diámetro. En

tre borde y borde del central con los restantes queda una separación de 4 mm. de agar.

En un extremo del portaobjetos se dispone una roseta de 6 pocillos simetricamente repartidos alrededor de uno central. En el otro lado del portaobjetos, la roseta es de sólo 4 pocillos, simétricamente situados, y sirve de control, al poner en todas ocasiones un mismo antígeno y un mismo antisuero. Aquellas pruebas que fallen por cualquier causa, la aparición de las bandas de este sistema, se dan por nulas.

Colocado el porta con la tira de agar, ya bien solidificada sobre el patrón de distribución que se desea, se practican los pocillos con un sacabocados calibrado y se extraen los discos de agar con una pequeña presión negativa en el interior de la pieza de tubo de goma acoplada al extremo libre del sacabocados.

Si la operación se lleva a cabo con minuciosidad desde sus comienzos, no es preciso soldar los bordes interiores de los pocillos al vidrio para evitar la infiltración de los reactivos por los espacios libres entre el portaobjetos y la tira de agar.

En la figura II.4. indicamos la disposición de los pocillos que empleamos.

II.4.3.4. Colocación de las muestras:

Para la medida de potencia de los in^munosueros se coloca en el pocillo central el complejo antigénico proprio para análisis (II.3.4.) a la concentración normal y en los periféricos, diluciones pregresivas en suero fisiológico del in^munosuero homólogo, desde el 1/1 al 1/32.

Para colocar las muestras empleamos jeringuillas tipo insulina y agujas muy finas. (Pipeta Pasteur, del tipo desechable, Fisher). Luego se colocan en cámara húmeda, en posición perfectamente horizontal.

II.4.3.5. Difusión y precipitación.

A 37° C. y asegurada una humedad alta, empiezan a aparecer algunas bandas ya a las 4 horas. No obstante, para una buena precipitación y formación de bandas nítidas, es preferible prolongar la difusión hasta 24 horas.

Las bandas aparecidas pueden ser fotografiadas en fresco con iluminación lateral sobre fondo oscuro, además de dibujadas y medidas.

II.4.3.6. Lavado y secado.

El exceso de suero o antígeno que ensucia las placas, se extrae de los pocillos con agua destilada y luego pasan por dos lavados de dos horas cada uno en tampón de pH 7, 2:

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, M/5 250 ml.

Na OH, M/5 250 ml.

Cl Na 36 g.

Azida de sodio 0,5 g.

Agua destilada 4,5 L.

Si se desea reforzar las bandas formadas, se introducen, durante 2 a 3 horas, en mezcla de 3 ml. de ClH , 1N y 97 ml. de alcohol de 96%.

Terminado el lavado, las placas de agar son cubiertas por tiras de papel de filtro, de manera que no queden en los pocillos burbujas de aire que agrietarían la película. La estufa a 37°C ., proporciona luego un secado rápido y profundo. Las tiras de papel de filtro suelen salir sueltas espontáneamente, si no es así, se extraen humedeciéndolas ligeramente con agua destilada.

La fina película de agar, totalmente transparente, permite el almacenado o tinción.

II.4.3.7. Tinción:

Se elige el colorante Rojo Thiazina por ser el que mejor rendimiento da según nuestra experiencia en cuanto a visualización de bandas débiles se refiere, y, al mismo tiempo, permite sacar copias fotográficas di

rectamente en papel.

Los portas, con la tira de agar bien seca, después de un baño de 3 a 4 horas en el tampón de lavado citado, $\text{pH}=7,2$ sufren dos baños de 10 minutos en agua destilada y, finalmente, otro de 24 horas en solución al 0'2% de Rojo Thiazina en tampón de acetato;

Acido acético anhidro.....0,6 ml.

Acetato sódico.....0,82 g.

Rojo Thiazini.....0,4 g.

Agua destilada.....200 ml.

Al tiempo de sacar las placas, se lavan en agua destilada y se pasan a acético al 1%, renovado dos o tres veces, hasta que el campo quede suficientemente decolorado. Luego sufren otro lavado de 10 minutos en mezcla de ácido acético al 1% con glicerina, también al 1%.

El secado final se realiza cubriéndolas nuevamente con papel de filtro humedecido en acético al 1% y dejándolas inclinadas a la temperatura ambiente. Una vez completamente secas, ya pueden ser fotografiadas o almacenarse, después de un baño rápido en gelatina al 1%.

II.4.3.8. Lectura y elección:

Bien directamente en fresco o bien después del teñido, se observa la menor concentración de cada inmuno-

suero a la que, aún, forma alguna banda de precipitación visible con su antígeno homólogo. Se hacen las diluciones siguientes: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32, y cuando alcanza esta última se da por bueno el in^munosuero y se procede a su obtención (II.2.2.).

Para hacer la elección de los in^munosueros que se van a estudiar intensivamente, uno por cada antígeno, los criterios fueron el mayor nivel de anticuerpo, el mayor número de bandas de precipitación y su mayor nitidez.

Recogidos los frascos estériles, fueron conservados en congelador a -20° C., hasta su utilización, ya que disolviendo los extractos secos con agua destilada, ya sea añadiendo preparados enzimáticos para la absorción de anticuerpos, vease II.3.4.

II.5. Técnicas analíticas de proteínas.

II.5.1. Electroforesis simple sobre gel de agar.

Realmente la separación por electroforesis en gel de agar es la base de todo nuestro sistema analítico. Sobre su resultado se verifican luego diversas operaciones condecientes a revelarlo, microbiología, química o inmunológicamente.

II.5.1.1. Condiciones generales:

Disponemos de cubeta Shandon modelo U-77, para microelectroforesis de 20 portaobjetos de capacidad, fuente de alimentación Shandon, modelo Vokam, con entrada de 220 V., de corriente continua, con regulación de voltaje y de amperaje. La técnica usada por nosotros es , fundamentalmente, el micrométodo de Scheidegger.

II.5.1.2. Soporte semisólido:

La confección de gel de agar está descrita para el método de doble difusión, II.4.3.1., con la única diferencia de hacerse necesaria su esterilización previa cuando se pretende después verificar el revelado micro - biológico.

II.5.1.3. Preparación de las placas:

Vale lo dicho en II.4.3.2., con la única salvedad de que, antes de ser vertido el agar fundido, ha de colocarse sobre el porta una o dos barritas metálicas, según el patrón elegido para esa ocasión con el objeto de llevar a cabo una inmunoelectroforesis.

II.5.1.4. Disposición de los pocillos:

Actuamos con varios patrones o modelos, con elección del más adecuado para cada caso. Se trata de

simples pocillos centrados para el revelado químico, mientras que para el inmunológico precisa una mayor complicación y que describiremos en II.7.

II.5.1.5. Colocación de las muestras:

Cada portaobjetos de los 8 colocados de una sola vez en la cubeta, lleva casi en los bordes del gel dos pequeños pocillos (1,5 mm. de diámetro) a una distancia dada y que en nuestro caso fue de 4,4,5, 6 5 cm., según los casos. Momentos antes de conectar la corriente se coloca una pequeña cantidad de azul de bromofenol (0,01 g., más 0,15 ml de Na OH N/10 y enrasar a 25 ml. con agua destilada y desionizada), en el pocillo situado en el polo negativo de la corriente eléctrica.

II.5.1.6. Control:

Cada operación lleva siempre una placa control con suero humano normal y dextrano en pocillos centrados de 3 mm. de diámetro.

II.5.1.7. Conexión eléctrica:

Después de colocados en sus posiciones los portas se recubren en sus extremos con tiras de papel de filtro de 3 cm., de anchura, previamente humedecidos con el tampón. Entre los extremos de estos papeles, que tocan el agar, deben quedar 6 cm., de separación, mientras que sus

extremos opuestos se introducen en el tampón.

Realizada la conexión y tapada la cubeta, se da paso a la corriente. Es imprescindible anotar el momento de puesta en marcha para calcular la movilidad absoluta.

Cuando llega el azul de bromofenol al pocillo opuesto de cada porta, se corta el paso de la corriente, se saca el que haya llegado y se coloca otro en su lugar, para evitar una sobrecarga eléctrica de los más lentos. Con esto se consigue, que en todos los portas el recorrido de azul de bromofenol sea exactamente el mismo, y por tanto, deducimos que el de las proteínas, también lo debe ser.

II.5.1.8. Tinción y revelados diversos:

Con los portas problemas salidos de la cubeta, ha de actuarse en cada caso como se indicará oportunamente según que la finalidad perseguida sea revelado químico o inmunológico.

Con las placas de control, se emplean las técnicas usuales para coloración de proteínas por un lado y de tinción del dextrano por otro.

II.5.1.9. Cálculo de movilidades:

Independientemente de las peculiaridades pro -

pías de cada sistema de revelado, el cálculo de movi-
lidades se hace como sigue:

II.5.1.9.1 Movilidades absolutas:

Una vez determinada la posición del dextrano, se miden las distancias recorridas por las diferentes zonas obtenidas. Considerando como punto representativo de cada una, aquel en que su mayor transversal corta perpendicularmente a la dirección del desplazamiento electroforético que coincide con la dimensión mayor de cada zona.

Sabido así mismo el potencial por cm. y el tiempo empleado, en segundos, aplicamos la fórmula:

$$U \text{ abs.} = \frac{D.}{H. t.} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1}$$

Donde:

D = recorrido real, con respecto al dextrano, en cm.

H = campo en voltios/cm.

t = duración en segundos.

Los valores finales, muy pequeños, se multiplican por 10.000, por lo que las unidades reales de los números que indican las movilidades absolutas, serán:

$$10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ seg}^{-1}$$

II.5.1.9.2. Movilidades relativas.

Se toma como punto de referencia la albúmina de suero humano normal detectada después de la electroforesis por tinción con Rojo Thiazina.

Una vez obtenidas las distancias reales recorridas por el problema y la albúmina (añadiendo el desplazamiento aparente el sufrido por el dextrano hacia el ánodo), el cociente entre ambas, nos da las movilidades electroforéticas relativas a la albúmina.

$$U \text{ alb.} = \frac{Dx}{D \text{ alb.}}$$

Siendo:

$U \text{ alb.}$ = movilidad relativa a la albúmina.

Dx = recorrido real de la zona problema en cm.

$D \text{ alb.}$ = recorrido real de la albúmina humana real en cm.

En toda la exposición del presente trabajo, empleamos como dato característico de cada zona o banda, el número que indica; el tanto por ciento, la movilidad relativa de cada zona enzimáticamente activa o de cada banda.

II.6. Técnicas analíticas de esteroides.

En nuestro estudio, junto con el análisis inmunológico de la dinámica enzimática, hemos pretendido llegar, lo más cerca sobre los pasos que vamos dando así como en algunos casos, nos prestaría la confirmación de algunos supuestos, expuestos en las conclusiones de este trabajo.

Las técnicas utilizadas fueron las expuestas en los apartados sucesivos.

II.6.1. Adición del sustrato.

Una vez que los cultivos de microorganismos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, procedimos a la adición del sustrato, en este caso concreto, la Sustancia S de Reichstein, en cantidades de 50 mg. por Erlenmeyer de 250 ml., que contenían 100 ml. de cultivo bacteriano.

El sustrato, se disolvía en caliente, en 2 ml. de metanol, en Bañomaría, procediendo a su vertido con las precauciones necesarias para prevenir la contaminación de los cultivos.

III.6.2. Extracción de los productos de reacción.

Después de cultivar los microorganismos con

el sustrato, durante cuatro días, a 30° C., sin agitación, procedimos a la extracción, mediante un disolvente orgánico, de los restos de sustrato y de los productos de transformación.

Para esta operación utilizamos Acetato de Etilo, procediendo a colocar el cultivo bacteriano, en fracciones de unos 200 ml., en un embudo de decantación, al que añadíamos unos 100 ml. del eluyente, agitando en un embudo y recogiendo la capa acuosa por un lado y la capa orgánica por otro. Esta operación la repetíamos por tres veces, para tener la seguridad de que conseguíamos una extracción completa.

Reunimos, por un lado, la fracción acuosa y, por otro, la del eluyente, para comprobar posteriormente la completa extracción de los esteroides.

Para desecar completamente el eluyente Acetato de Etilo, colocamos en el matraz en que recogemos esta fracción, sulfato sódico anhidro, dejándolo en reposo unas horas.

La capa acuosa de esta extracción llevará los componentes solubles en agua, como sales, componentes celulares, etc., mientras en la capa orgánica hemos separado los componentes orgánicos.

II.6.3. Análisis de los componentes extraídos.

Esta operación la realizamos mediante la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice, técnica que describimos a continuación, tratando, por un lado , la capa acuosa, para evidenciar que la extracción ha sido completa y, por otro, la capa del acetato de etilo, para ver de cuántos componentes consta.

II.6.3.1. Análisis de los componentes extraídos con acetato de etilo:

La primera operación que hemos de realizar , es concentrar esta fracción, mediante el empleo de un rotavapor, BUCHE, Rotavapor-R, hasta llevar a sequedad redisolviendo de nuevo en un disolvente apropiado, que puede ser cloroformo, para colocar el sistema en una placa y realizar la cromatografía en capa fina, que nos revelará, de una forma orientativo, si hemos conseguido transformación y de cuántos componentes disponemos en el sistema.

II.6.3.2. Análisis de la fracción acuosa.

En esta fracción se encontrarán los restos celulares, así como las sustancias insolubles en acetato de etilo. Como se recordará, en la Introducción de-

cíamos que Kawara, Wang, Talalay (1960 y 1962), Gale y col. (1962), encuentran que las enzimas responsables de muchas transformaciones son intracelulares, por lo que hay que proceder al estudio de esta fracción, mediante disrupción ultrasónica del soma bacteriano, por si no había sido ya roto por la acción del acetato de etilo en la extracción, para liberar estos componentes y proceder a su estudio, por si algunos de ellos había sido incorporado al interior de la economía bacteriana.

Para ellos recogemos el extracto acuoso y lo concentramos de manera similar al extracto del eluyente orgánico, en rotavapor, redisolvemos y procedemos a la cromatografía en capa fina, por si nos revela la presencia de algún componente de tipo esteroide.

II.6.4. Cromatografía en capa fina.

Se utilizó gel de sílice de la casa Merck en capas de 0,25 mm. de espesor. Como eluyentes se emplearon mezclas de benceno-acetato de etilo en diferentes proporciones.

Las placas se revelaron pulverizándolas con una solución de ácido sulfúrico (4%), ácido acético (80%), y agua (16%), calentándolas posteriormente a

120² C. durante unos minutos.

Además de las manchas obtenidas y visibles a simple vista, se visualizaron a la luz de una lámpara ultravioleta, de Ultraviolet Products, a 254 nm. de longitud de onda, en que adquirirían las manchas correspondientes a los esteroides presentes, una fluorescencia amarilla.

II.6.5. Cromatografía en columna.

El tipo de columna utilizada es la denominada comunmente como columna seca. En ellas se utilizó gel de sílice de la casa Merck, de 0,2 a 0,05 mm. (Actividad II - III).

II.6.6. Puntos de fusión.

Los puntos de fusión están sin corregir y fueron determinados en un aparato Kofler.

II.6.7. Espectros infrarrojos.

Se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod. 257. En células de 0,1 mm. y disolviendo en cloroformo.

II.6.8. Espectros ultravioletas.

Se llevaron a cabo en un espectrofotómetro, Perkin-Elmer, mod. 402., empleándose células de 0,5 mm.

de espesor, y etanol como disolvente.

II.6.9. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Se realizaron en un espectrógrafo Perkin-Elmer, mod. R. 12B. Utilizando tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Se empleó cloroformo como disolvente.

II.7. Estudio Inmunológico.

II.7.1. Inmunodifusión.

En la comprobación de la riqueza del título de anticuerpos del inmunosuero preparado como anteriormente expusimos, empleamos la técnica de doble difusión en gel, según Ouchterlony, o inmunodifusión bidimensional en gel de agar (Chordi y Kagan, 1964; Chordi y col., 1962; Tor-mo y Chordi, 1965. La razón por la que empleamos esta técnica la exquesita sensibilidad que presenta, aún ma - yor que la obtenida mediante la inmunolectroforesis, por lo que la empleamos continuamente para seguir el proceso de inmunización, comprobación del título de anticuerpos, y la detección de su presencia.

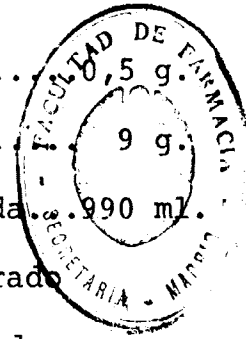
II.7.1.1. Preparación del soporte semisólido.

Se utiliza gel de agar al 2% en un medio lí - quido, compuesto de agua destilada y desionizada y un tampón veronal a pH 8,5 y fuerza iónica 0,385. Su prepa - ración la realizamos de la siguiente forma:

Se disuelve el agar en agua destilada y desio - nizada, operación que se realiza al bañomaría, hasta que se disuelve el agar por completo, quedando el líquido perfectamente transparente. El agar empleado es el Agar Noble de la casa Difco. A continuación se añade la solu -

ción de tampón veronal, a una temperatura de 37° C. Dicho tampón se prepara de la siguiente manera:

Azida de sodio..... 0,5 g.
Dietil barbiturato sódico... 9 g.
Agua destilada y desionizada... 990 ml.
ClH (8,3 g. de ClH concentrado
en 91,7 ml. de agua destilada y
desionizada)..... 10 ml.



Una vez realizada la mezcla, la pasamos a tubos de ensayo, la dejamos solidificar y la guardamos en nevera hasta su utilización.

La doble difusión se lleva a cabo en portaobjetos normales de microscopía, sobre los que depositamos el agar fundido, al bañomaría, en una cantidad de 3,5 ml. por portaobjetos, lo dejamos solidificar, y lo guardamos en cámaras húmedas, con un conservador de merthiolato de mercurio como conservador. Estas cámaras húmedas las confeccionamos con unas Placas Petri de 14 cm. de diámetro, dentro de las cuales ponemos una placa petri de 10 cm. de diámetro como soporte de los portaobjetos. Colocamos agua y merthiolato al 1/1000, con un algodón, para conseguir el ambiente húmedo deseado.

Una vez preparado el porta y para su utiliza -

ción, se coloca sobre una plantilla en que tenemos dibujado el modelo de pocillos que vamos a utilizar y que recogemos en la figura N^º II.4., en que vemos los diferentes modelos de pocillos que utilizamos en nuestro trabajo. Estos pocillos tienen un diámetro de 2 mm. y se colocan simétricamente y a la misma distancia unos de otros, distancia que era de 2 mm. también.

Hechos los pocillos, según la disposición más conveniente a los fines que nos proponíamos en cada caso, se colocaba en uno o más de ellos, el in^{mu}nosuero y en los otros, que queríamos enfrentar al mencionado in^{mu}nosuero, los antígenos que queríamos analizar.

Una vez realizada esta operación, se colocan los portaobjetos en la cámara húmeda y se llevan a la estufa a 37^º C. para el desarrollo de la reacción. A las 24 horas, se podían ya leer los resultados.

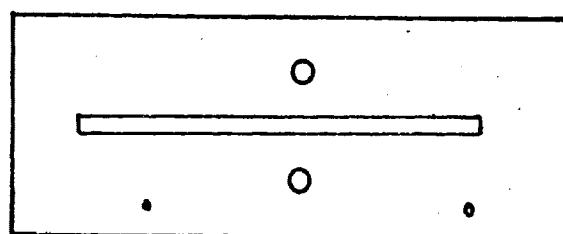
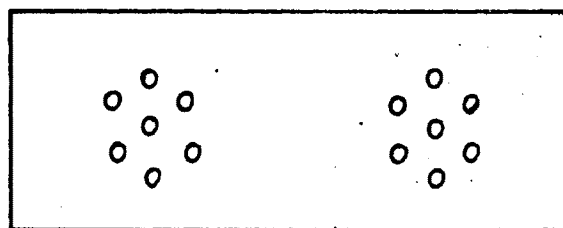
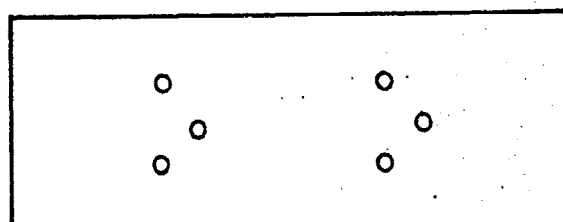
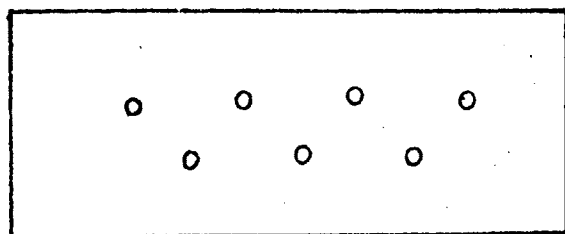
II.7.1.2. Lectura de los resultados.

Se realiza mediante un visor de campo oscuro, de la casa Shandon Southern, en que colocamos los portas en la mirilla superior, visualizándose perfectamente las bandas de ^{re}precipitación, mediante la luz lateral del visor, lo que nos permite su dibujo y fotografía.

Fig.II.4.-Esquema de la disposición de los pocillos en los distintos tipos de inmunodifusión según Ouchterlony empleados.



Fig.II.5.-Esquema de la disposición de los pocillos y canales para la inmunoelectroforesis.



II.7.2. Inmunoelectroforesis.

Se utilizó esta técnica para individualizar cada uno de los antígenos obtenidos de las distintas preparaciones bacterianas. Se utilizó el micrométodo de Scheidegger (1955) con las modificaciones descritas por Martí - nes Reja y col. (1969).

II.7.2.1. Material.

Es el mismo utilizado para la electroforesis simple.

II.7.2.2. Preparación de portaobjetos.

Fue similar a la descrita para la electroforesis. Una diferencia fundamental en la preparación de portas para inmunoelectroforesis consistió en la elaboración de canales, uno o dos, destinados a contener los inmunosueros. Estos canales se practicaban en el seno del agar y en el centro del porta, en sentido longitudinal, paralelamente al eje mayor del porta. La longitud de los canales era de 4,5 cm. La preparación de estos canales se realizaba mediante varillas metálicas de 2 mm. de diámetro y 50 mm. de longitud. Estas barritas se colocaban sobre el portaobjetos antes de verter el agar fundido. Este ocupa la superficie del portaobjetos, a excepción del espacio ocupado por la varilla, que, al solidificarse el

79
agar y retirarse, dejaba excavado un surco en el agar, en forma de canal. La excavación de pocillos se hizo exactamente igual que para inmunodifusión y la electroforesis, mediante un sacabocados. Los pocillos más utilizados consistieron, para este trabajo, en un canal central y dos pocillos laterales, o dos canales laterales y un pocillo central, tal como representamos en la figura II.5.

II.7.2.3. Electroforesis.

Los portaobjetos preparados con pocillos y canales, se colocaban en una cubeta de electroforesis Shandon, U-77. Los pocillos se rellenaban con el antígeno correspondiente y se sometían al paso de la corriente eléctrica en las mismas condiciones descritas para la electroforesis simple en agar.

II.7.2.4. Inmunodifusión.

Concluida la electroforesis, la placa central conteniendo suero humano y dextrano, se introducía en un baño de ácido acético al 2% con el fin de fijar las proteínas y el dextrano. Así fijadas podrían analizarse y calcular los desplazamientos respectivos. Los portales se colocaban en una cámara húmeda. Los canales se rellenaban con el inmunosuero correspondiente, mediante un capilar y se introducía en estufa a 37° C., donde se mantenían 8 a 24 horas.

II.7.2.5. Lectura de resultados.

Finalizado el tiempo de inmunodifusión, se estudiaban las preparaciones en fresco. La visualización de las bandas de precipitación, resultado de la reacción obtenida en el seno del agar entre los antígenos separados por electroforesis y los antisueros contenidos en el canal, se hacía con iluminación en fondo oscuro, con un visualizador. El estudio detenido de cada una de las preparaciones y la elaboración de esquemas donde se hacía constar el número de bandas, su morfología, intensidad y movilidad electroforética, permitía conveccionar un patrón relativo de los antígenos diferenciados por esta técnica.

Sistemáticamente se efectuaban inmunolectroforesis de cada sistema a estudiar por triplicado, para una mayor seguridad en la interpretación de las preparaciones.

II.7.2.6. Reforzamiento de las bandas de inmunoprecipitación por ácido tánico.

Cuando el sistema antígeno-anticuerpo analizado daba lugar a bandas de precipitación muy débiles, se pudo comprobar que el ácido tánico producía un reforzamiento de las precipitaciones en el sentido que aumentaba la in-

61

tensidad de las bandas. Mediante esta técnica se consiguió incluso, poner de manifiesto arcos de precipitación que no habían sido observados a simple vista. El procedimiento consistía en sumergir durante 20 minutos las portas, previamente lavados en una solución al 1% del ácido tánico.

II.7.2.7. Tinción de proteínas

Terminada la difusión, los portas son lavados durante 48 horas. Posteriormente se secan bajo papel de filtro, y, por último, se procede a su tinción. La tinción para proteínas, en general, ha sido a base de Rojo de Thiazina, según la técnica descrita en II.5.1.8.

II.7.2.8. Cálculo de movilidades de las bandas de precipitación.

II.7.2.8.1 Movilidad absoluta.

Se calculan de forma totalmente igual al empleado en el cálculo en la electroforesis simple en agar, con la única variación de que, aquí, medimos los desplazamientos de los arcos de precipitación correspondientes a los antígenos desplazados por electroforesis. Se toma como punto representativo de cada arco, de la curva, el que corresponde al centro de la zona ocupada por el antígeno. Generalmente, en los arcos simétricos, el centro coincidía con el acmé de las curvas, en el caso de curvas asimétricas, o

aplanadas, se tomaba como centro el punto medio.

II.7.2.8.2. Movilidad relativa.

Se toma como referencia la albúmina del suero humano normal, detectada después de cada electroforesis, por tinción con el Rojo de Thiazina.

Una vez obtenidas las distancias reales recorridas por cada banda de inmunolectroforesis, y por la albúmina, añadiendo el desplazamiento aparente sufrido por el dextrano hacia el ánodo, se calculaba la movilidad relativa en forma totalmente similar a la efectuada en la electroforesis simple sobre gel de agar.

II.8. Sistemática de estudio.

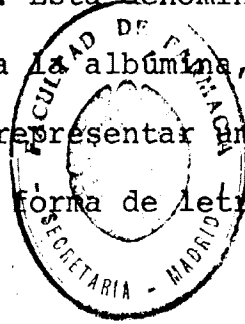
Como hemos expuesto en los objetivos de nuestro trabajo, I.3., nuestra intención es la de aportar algunos datos para un mayor conocimiento de la dinámica de la transformación bacteriana de los esteroides. No solamente en el conocimiento de la composición antigénica de las cepas estudiadas, caso del análisis inmunolectroforético directo de los sistemas homólogos, por el enfrentamiento de cada antígeno bacteriano con su antisuero homólogo, obtenido mediante el proceso de inmunización de los conejos, sino correlacionar las identidades antigénicas de las cepas entre sí, así como completar el estudio

mediante la confección de un esquema completo de los efectos de la inducción y represión enzimática, representados por los cambios habidos después de la adición del sustrato esteroide.

Este estudio implicaba no sólo un enfrentamiento directo de los sistemas homólogos, sino la confección de un patrón de estudio con enfrentamientos cruzados de los distintos sistemas implicados, bien de antígenos con antisueros simples o mediante la absorción de componentes comunes, para eliminarlos y ver cuáles nos quedaban como componentes propios de cada sistema ensayado.

Todos los supuestos ensayados se realizaban por triplicado cada vez, para tener mayor seguridad en la constancia de los resultados. De cada uno de los sistemas se hacía un esquema, que no era sino la síntesis de los resultados obtenidos en preparaciones individuales. En ocasiones, los resultados no eran todo lo claras que fuera de desear y se hacía necesario recurrir a la esquematización de las bandas de precipitación que, a simple vista, podrían enmascarse o interferirse. En estos casos, el estudio detallado y minucioso de cada preparación permitía aclarar la disposición de las bandas de precipitación, su morfología y situación.

Una vez individualizada cada banda, se caracterizaba, asignándole una denominación que permitiese, en cualquier momento, referirse a ella. Esta denominación correspondía a su movilidad relativa a la albúmina, diferenciando entre sí a las que pudiesen representar una movilidad idéntica, mediante un sufijo en forma de letras minúsculas.



Así podemos diferenciar, por un lado, los enfrentamientos directos, representados en la Tabla I., de los enfrentamientos sencillos en que podemos encontrar la composición antigénica de cada sistema homólogo, la comunidad antigénica que pueda haber entre las cepas iniciales y las variaciones experimentadas por la presencia del sustrato esteroide, tanto de cada cepa bacteriana, como las interrelaciones que puedan existir entre ambas, en ambos supuestos.

Por otro lado confeccionamos una sistemática de estudio complementaria, mediante el empleo de enfrentamientos de los sistemas antigénicos absorbidos, tal como describimos en el apartado II.3.4.

En esta pauta utilizamos los siguientes sistemas:

1.- El antígeno correspondiente al B. sphaeri -

cus sin esteroides, enfrentado al in^{mu}nosuero homólogo, absorbido con el antígeno correspondiente al B. sphaericus con esteroides, en este caso, los sistemas enzimáticos implicados serían, componentes comunes a ambos sistemas, que se combinarían al enfrentarse, componentes inducidos por el sustrato, que los llevaría solamente al B. sphaericus sin esteroides solamente, por lo que quedarían libres en el in^{mu}nosuero.

Al enfrentarlos, se combinarían los componentes comunes, libres del antígeno y el in^{mu}nosuero, que, en este caso serían los correspondientes a los reprimidos por el sustrato esteroide.

Como control de que la absorción se realiza correctamente, enfrentaremos, también, por separado, el antígeno B. sphaericus con esteroides, al in^{mu}nosuero anti B. sphaericus sin esteroides, absorbido con el antígeno con esteroides, que nos deberá dar una reacción negativa, al ser todos sus componentes comunes absorbidos del in^{mu}nosuero por la presencia del antígeno utilizado.

Para representar este sistema utilizaremos, en adelante la fórmula siguiente:

$$B S E / \text{Anti } B S E (B C E).$$

Al sistema reaccionante, y:

B C E / Anti B S E (B C E).

Al control de absorción.

2.- Antígeno correspondiente al B. sphaericus con esteroides, que llevará los componentes antigénicos no modificados por el sustrato y los inducidos por su presencia, frente al inmunosuero anti B. sphaericus con esteroides, absorbido con el antígeno correspondiente al B. sphaericus sin esteroides, El inmunosuero llevará los componentes no modificados por el sustrato y los inducidos por él. El antígeno B.sphaericus S.E., llevará los componentes no modificados y los reprimidos, por lo que quedarían eliminados del sistema reaccionante, los comunes, o sea los no modificados, quedando libres, en esta absorción, los inducidos del antígeno del B. sphaericus con esteroides, con lo que obtendríamos estos componentes.

Como control de absorción utilizaremos el sistema Antígeno B. sphaericus sin esteroides, enfrentado al mismo inmunosuero anterior, el anti B. sphaericus con esteroides, absorbido con el antígeno B. sphaericus sin esteroides, que nos deberá dar respuesta negativa ya que quedan eliminados los componentes comunes con dicha absorción.

Este supuesto lo representamos de la forma si-

guiente:

B C E / Anti B C E (B S E).

En que obtendremos los componentes reprimidos y, como control de absorción:

B S E / Anti B C E (B S E).

3.- Enfrentando el antígeno correspondiente al *Arthrobacter simplex* sin esteroides, que llevará como componentes los correspondientes a los no modificados por el sustrato, así como los reprimidos por la presencia del sustrato esteroide, frente al inmunosuero anti A. *simplex* sin esteroides, absorbido con el antígeno del A. *simplex*, con esteroides. En este sistema nos encontramos con los siguientes elementos, en el inmunosuero, los componentes, no modificados por el sustrato y los reprimidos por su presencia y en el antígeno, absorbente, también los no modificados, que serán comunes, y los inducidos, por lo que quedaría, eliminados los no modificados, con lo que quedarían libres para combinarse con el antígeno utilizado en la reacción inmune, los componentes reprimidos, que nos quedarían así evidenciados.

Como control de absorción utilizamos el inmunosuero anterior, frente al antígeno absorbente, A. *simplex* con esteroides, que nos deberá dar reacción negativa.

Para exponer este sistema, lo representamos, en adelante, de la manera siguiente:

A S E / Anti A S E (A C E).

En que tendríamos los componentes reprimidos, y el control de absorción:

A C E / Anti A S E (A C E).

4.- Antígeno de Arthrobacter simplex con esteroides, cuya composición será los no modificados por el sustrato y los inducidos por él. Lo enfrentamos al inmunosuero anti Arthrobacter simplex con esteroides, absorbido con el antígeno A. simplex sin esteroides. El inmunosuero lleva componentes no modificados por el sustrato junto con los reprimidos, por lo que quedarían eliminados del conjunto los no modificados, por lo que, al enfrentarle al antígeno A. simplex con esteroides, obtendremos los componentes inducidos por el sustrato.

Como control de absorción utilizamos el antígeno A. simplex sin esteroides, que lleva los componentes no modificados y los reprimidos frente al mismo inmunosuero, con lo que tendríamos una respuesta negativa si la absorción ha sido total.

Este sistema lo representamos de la siguiente manera:

A C E / Anti A C E (A S E).

Que nos dará los componentes inducidos y, como control de absorción:

A S E / Anti A C E (A S E).

Hasta aquí hemos estudiado cada cepa bacteriana por separado, en que, combinando convenientemente los resultados obtenidos en los diversos enfrentamientos, directos y previa absorción, podremos ver la composición total de los componentes antigénicos de cada cepa bacteriana, tal como exponemos en los apartados III. 5., y siguientes. Pero también pretendemos, como expusimos en los objetivos de este trabajo, los componentes antigénicos que fuesen comunes a ambos sistemas bacterianos, por lo que tendremos que completar el estudio, mediante la realización de los sistemas siguientes, cruzados.

5.- Antígeno correspondiente al A. simplex con esteroides, que llevará consigo los componentes no modificados y los inducidos por el sustrato, frente al inmunosuero anti B. sphaericus con esteroides, absorbido con el antígeno B. sphaericus sin esteroides, que llevan, el inmunosuero, los componentes no modificados y los inducidos por el sustrato y el antígeno absorbente, los componentes no modificados y los reprimidos por el sustrato.

De esta forma obtendríamos los componentes antigénicos inducidos por el sustrato y que sean comunes a ambas especies bacterianas.

Como control de absorción utilizamos el mismo inmunosuero frente al antígeno B. sphaericus sin este - roides, que deberá dar reacción negativa.

Este sistema lo representamos así:

A C E / Anti B C E (B S E).

Que nos daría los componentes inducidos, comu nes a ambas especies y, como control de absorción:

B S E / Anti B C E (B S E).

6.- Antígeno del B. sphaericus con esteroides cuya composición incluye los no modificados y los inducidos por el sustrato, frente al inmunosuero anti A. sim plex con esteroides, con los componentes inducidos, y los no modificados, absorbido con el antígeno A. simplex sin esteroides, que lleva los componentes no modifica - dos y reprimidos por el sustrato. De esta forma obten - dremos los componentes inducidos por el sustrato este - roide comunes a ambos sistemas bacterianos.

Como control de absorción utilizamos el mismo inmunosuero absorbido frente al antígeno A. simplex sin esteroides, que nos deberá dar reacción negativa.

Este sistema lo representamos así:

B C E / Anti A C E (A S E).

Que nos dará los componentes comunes inducidos por el sustrato y el control de absorción:

A S E / Anti A C E (A S E).

7.- Antígeno A. simplex sin esteroides, con los componentes no modificados y los reprimidos por el sustrato, frente al inmunosuero anti B. sphaericus sin esteroides, que llevará los componentes reprimidos y los no modificados, absorbido con el antígeno B. sphaericus con esteroides, que lleva los componentes no modificados y los inducidos por el sustrato. Así obtendremos los componentes reprimidos, comunes a ambas cepas bacterianas.

Como control de absorción utilizamos el sistema compuesto por el mismo inmunosuero absorbido, frente al antígeno B. sphaericus con esteroides, que nos deberá dar respuesta negativa.

Estos sistemas los representamos así:

A S E / Anti B S E (B C E).

En que obtenemos los componentes reprimidos por el sustrato, que sean comunes a ambas cepas bacterianas, y como control de absorción:

B C E / Anti B S E (B C E).

8.- Antígeno del B. sphaericus sin esteroides, que lleva los componentes reprimidos por el sustrato y los no modificados por él, frente al inmunosero anti A. simplex sin esteroides, con los mismos componentes, no modificados y reprimidos, absorbido por el antígeno A. simplex con esteroides, cuyos componentes son los no modificados y los inducidos. En la reacción obtenida con este sistema obtendremos los componentes antigénicos reprimidos comunes a ambas cepas bacterianas.

Como control de absorción del inmunosero empleado anteriormente utilizamos el antígeno absorbente, o sea, el A. simplex con esteroides.

Estos sistemas los representamos así:

B S E / Anti A S E (A C E).

En que tenemos los componentes reprimidos comunes a ambas especies, y el control de absorción:

A C E / Anti A S E (A C E).

III. RESULTADOS

III. RESULTADOS.

Como decíamos en los objetivos del presente trabajo, uno de ellos era la búsqueda de los sistemas enzimáticos implicados en la problemática de la transformación microbiológica de esteroides, mediante la investigación de la dinámica enzimática expresada en la inducción y represión de estos sistemas, así como aclarar qué sistemas pueden ser considerados como constitutivos, mediante el análisis comparativo de las cepas bacterianas estudiadas, frente a un mismo sustrato esteroide, y considerando lo que sucedía en ellos según fuesen las cepas antes de la adición del sustrato esteroide o después de ella.

III.1. Análisis antigénico directo del Bacillus sphaericus sin esteroides.

En el análisis antigénico de esta cepa, Bacillus sphaericus, ATCC 7050, podemos distinguir dos partes, la pauta de inmunización seguida para la obtención de los inmunosueros correspondientes, mediante la inoculación en los conejos, según describimos en el apartado II.4.1., y el análisis inmunolectroforético realizado para la investigación de los sistemas antígeno-anticuerpo existentes, completado con las correspondientes comprobaciones.

paralelas de identificación de las bandas de precipita -
ción obtenidas en el mencionado análisis mediante inmuno
difusión, según la técnica de Ouchterlony, tal como des
cribimos en el apartado correspondiente, II.4.1.

III.1.1. Proceso de inmunización:

Mediante la inoculación a los conejos de los
extractos antigénicos obtenidos según describimos, ante -
riormente, II.2.2.1., siguiendo la pauta también descri -
ta, II.4.1., mediante la inyección de dichos extractos, en
una concentración de 10 ml/ml. Se emplearon los conejos
Nº. 72-2 y 72-3, según el Archivo de nuestro Departamen -
to, y cuyo peso era de 5 y 6 kilos, respectivamente.

Los datos relativos al número de inoculaciones
cantidades inyectadas, descanso entre los períodos de
inoculación y las sangrías parciales realizadas para el
control de la tasa de anticuerpos, los resumimos en la
Tabla II. En esta tabla se podrá observar que también in
cluimos los datos relativos a la tasa de anticuerpos ob
tenida en las distintas sangrías parciales realizadas, ex
presadas en la curva que presentamos en la figura III.
1., y cuyos resultados fueron obtenidos mediante la inmu
nodifusión, según Ouchterlony, enfrentando el antígeno
correspondiente a distintas diluciones del antisuero, con

Tabla II. Pauta de inmunización con el antígeno B S E.

PAUTA DE INMUNIZACION

CONEJO N° 72-2 y 73-3

ANTIGENO B.S.E

JAULA N° 2 y 3

CONCENTRACION. 10 mg/ml

Fecha	Inoculación N°	Día N°	Cantidad Ag. inoc.	Sangría N°	Tasa Ac. Ouchterlony
	<u>1° Serie</u>				
	1	1	1 ml	1	
	2	3	"		
	3	5	"		
	4	8	"		
	5	10	"		
	6	12	"		
	7	15	"	2	
	8	17	"		
	9	19	"		
	10	22	"		
	11	24	"		
	12	26	"		
	13	29	"		
	14	31	"	3	
	15	33	"	4	
	<u>2° Serie</u>				
	16	43	2 ml	5	1/8
	17	45	"		
	18	47	"		
	19	50	"	6	1/16
	20	52	"		
	21	54	"		
	22	57	"	7	1/32
	23	59	"		
	24	61	"		
	25	64	"	8	
	26	66	"		
	27	68	"		
	28	70	"	9	
	29	73	"		
	30	74	"	10	

Fig.III.1.-Curva de la tasa de anticuerpos obtenidos
en la inmunización de los conejos con el antígeno B S E

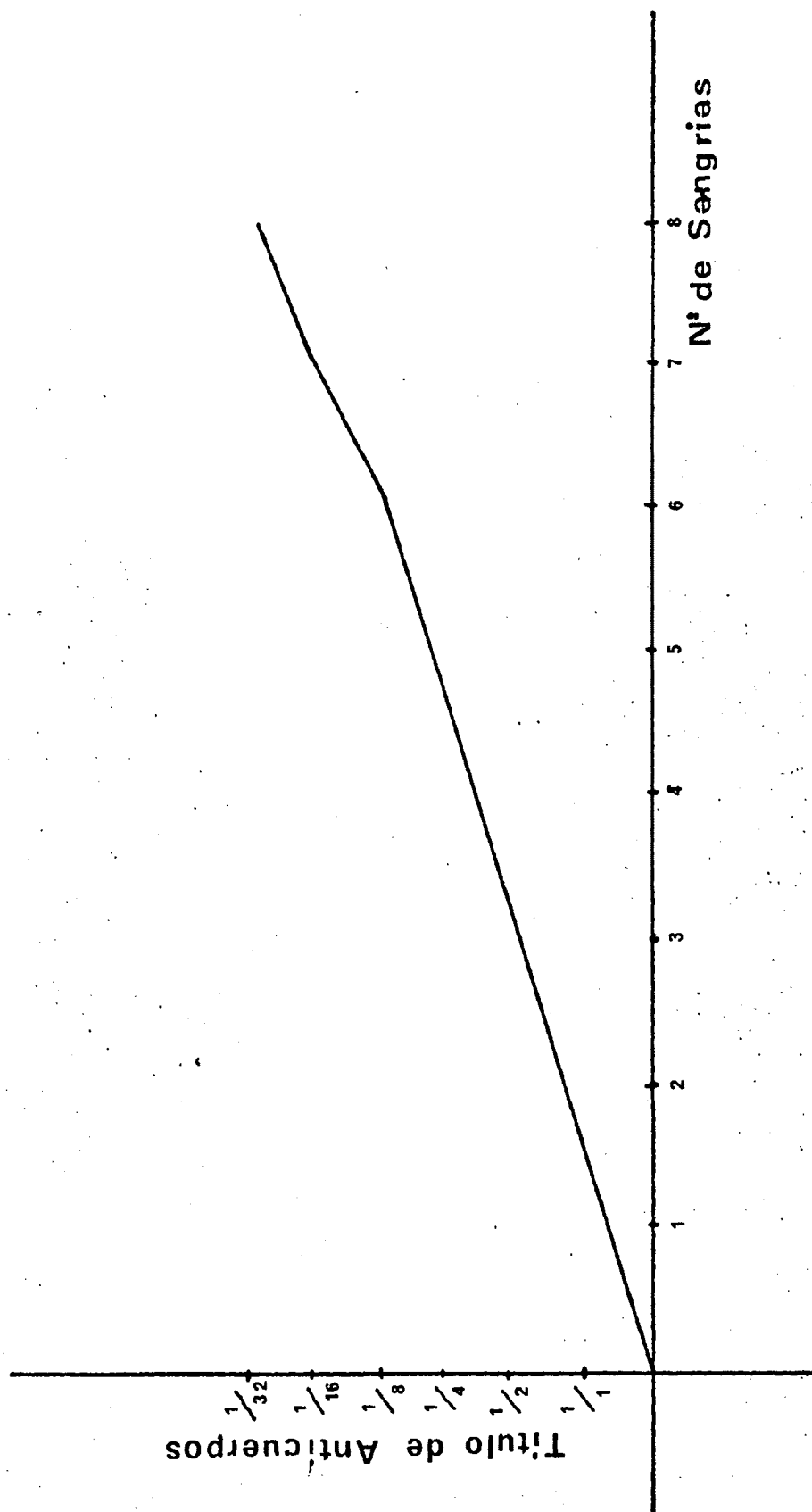
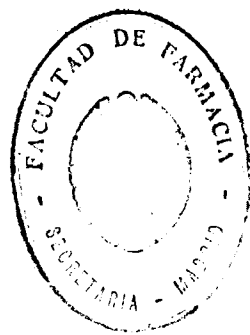


Fig.III.2.-Esquema representativo de los Ouchterlony
realizados mediante el enfrentamiento de B S E frente
al inmmunosuero anti B S E.

$$\frac{1}{2}$$

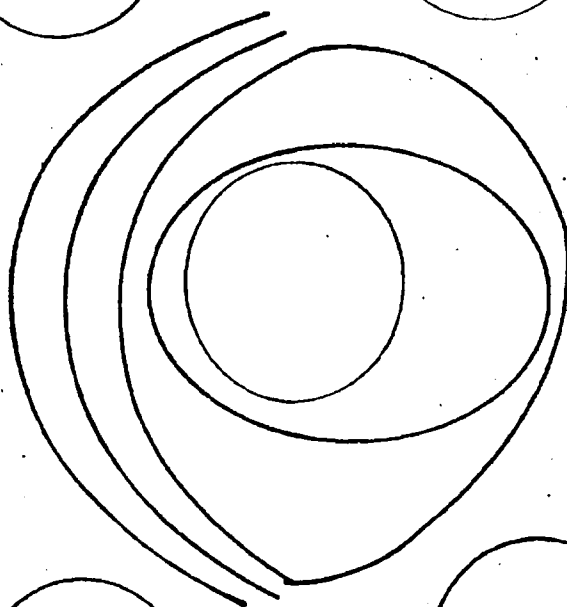
$$\frac{1}{4}$$

$$\frac{1}{8}$$

$$\frac{1}{16}$$

$$\frac{1}{32}$$

$$\frac{1}{1}$$



cretamente, las diluciones del 1/1 al 1/32 , límite que consideramos suficiente para la realización de las pruebas de inmunolectroforesis. Un esquema de las bandas obtenidas en estas pruebas de inmunodifusión, es el que está expresado en la Fig. N° III.2., en que podemos ver que se producen cuatro bandas de precipitación en la dilución 1/1, que se continúan éstas en reacción de identidad en la dilución siguiente, 1/2, que desaparece una de ellas al pasar a la dilución 1/4, que continúan las tres restantes en la dilución 1/8, desapareciendo otra en la dilución 1/16, continuándose éstas dos en la dilución 1/32, que consideramos como título suficiente para la realización de las inmunolectroforesis que realizaremos posteriormente.

En este estudio se enfrentaron, como antígeno, el B S E y como inmunosuero el anti B S E.

III.1.2. Análisis antigénico directo del sistema homólogo *Bacillus sphaericus*, ATCC 7055.

Este estudio se realizó mediante la inmunolectroforesis, descrita en II.5., enfrentando el antígeno B S E al inmunosuero anti B S E, o sea, el sistema homólogo del *B. sphaericus* sin esteroides. El objetivo perseguido en este supuesto fue el de averiguar la composi -

ción antigénica total del sistema mediante el enfrentamiento directo.

Los resultados obtenidos se representan en el esquema A de la Fig. III.3., fueron los siguientes, expresándolos en forma de bandas de precipitación agrupadas por su movilidad relativa a la albúmina.

Dos bandas de precipitación de movilidad -10 y -3, bandas muy marcadas, finas, ligeramente asimétricas, y de aparición constante en todos los sistemas ensayados.

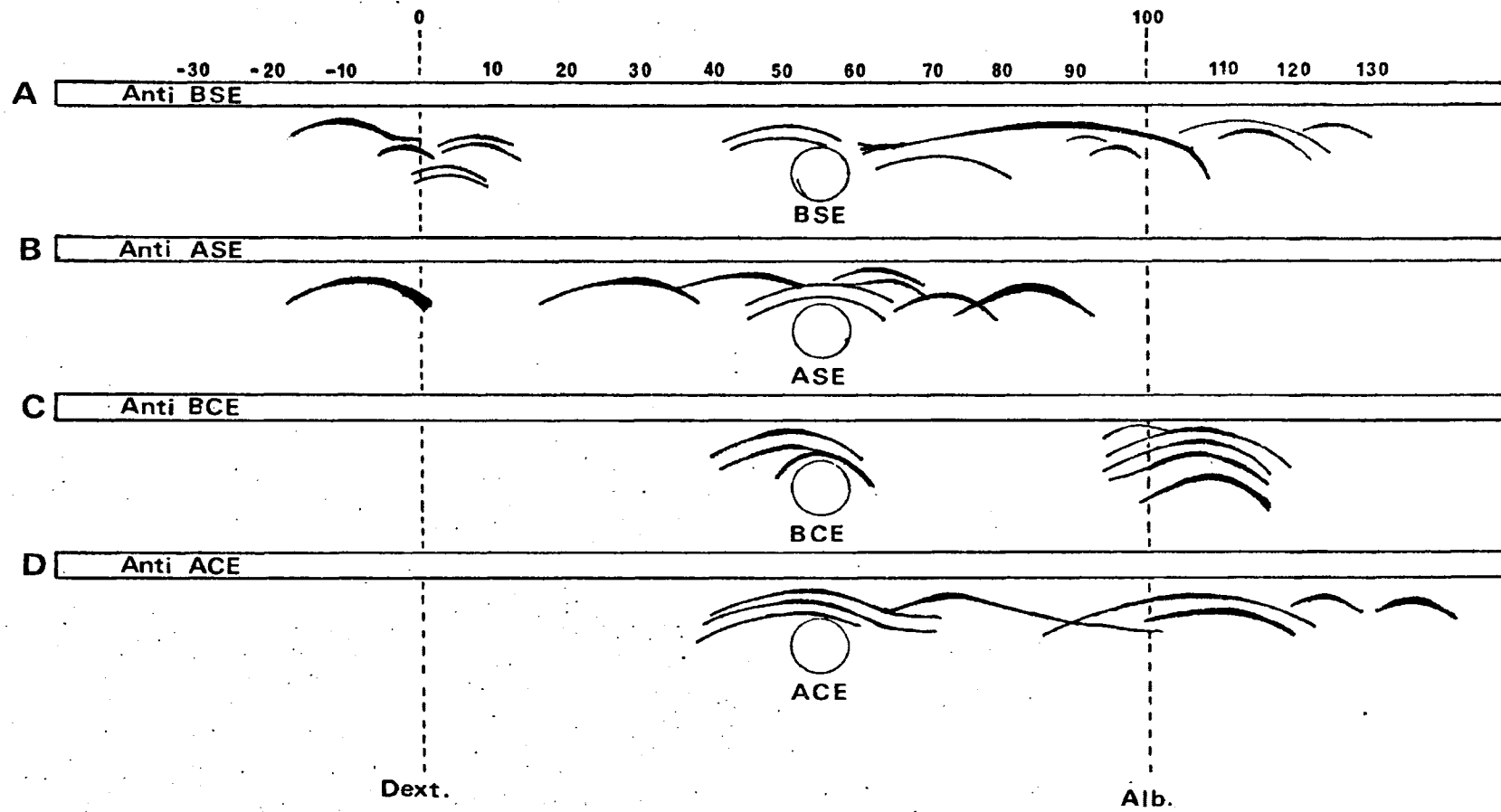
Dos bandas de precipitación de movilidad 3, de aparición constante en todos los ensayos efectuados, simétricos, concéntricas, finas, nítidas e intensas.

Dos bandas de precipitación, de movilidad 6, similares en características a las anteriores, excepto en que sólo aparecían en un 50% de los ensayos efectuados.

Dos bandas de precipitación, una de movilidad 50 y la otra de 53, que rodeaban el pocillo central, siendo unas bandas de aparición constante en todos los sistemas ensayados. Eran unas bandas intensas, más marcadas sin llegar a ser muy gruesas, nítidas, simétricas.

Una banda de movilidad 73, fina, poco marcada, constante en su aparición, nítida, con tendencia a aplam

Fig.III.3.-Esquema de las inmunolectroforesis realizadas enfrentando, en A el antígeno B S E frente al inmunosuero anti B S E, en B el antígeno A S E frente al inmunosuero anti A S E, en C el antígeno B C E frente al inmunosuero anti B C E, en D el antígeno A C E frente al inmunosuero anti A C E.



narse.

Una banda de precipitación de movilidad 90, larga, que parecía prolongarse con las de movilidades 93 y 96, y de idénticas características. Aplanadas, nítidas, intensas, de aparición constante.

Una banda fina, de movilidad 106, poco definida pero sin llegar a ser difusa, simétrica, de aparición constante.

Una banda de movilidad 113, paralela a la anterior, simétrica, fina intensa, constante también.

Una banda de movilidad 116,5, muy marcada, gruesa, que cortaba a las de movilidad 106 y 126, intensa, nítida, simétrica, de aparición constante.

Una banda de movilidad 126,6, cortada por la anterior, muy marcada, ancha, poco nítida, simétrica, y constante.

En total se obtuvieron, mediante este enfrentamiento, 16 bandas de precipitación para este sistema. Luego veremos que insistimos en el estudio del sistema antigénico completo mediante la construcción teórica, apartado III.5.1.4., coincidiendo en líneas generales.

100

III.2. Análisis antigénico directo del Arthrobacter simplex, ATCC 6946.

De manera similar a la llevada a cabo para el conocimiento de la composición antigénica total del *B. sphaericus*, procedimos al análisis inmunológico de esta cepa, con idéntica finalidad.

III.2.1. Proceso de inmunización:

Procedimos a la inoculación de los conejos N^o 72-10 y 72-11, de un peso de 4,5 y 5,3 kilogramos, con los extractos antigénicos obtenidos según describimos en el apartado correspondiente II.2.2.1., mediante la inyección en concentración de 10 mg./ml., siguiendo la pauta de inmunización ya descrita, II.4.1., y controlando la tasa de anticuerpos mediante la realización de sangrías parciales, y utilizando la técnica de inmunodifusión según Ouchterlony, mediante diluciones del suero del conejo del 1/1 al 1/32, cuyo título consideramos suficiente para la realización del estudio inmuno-electroforético de las bandas de precipitación correspondientes a la reacción antígeno anticuerpo.

Los resultados obtenidos, así como los datos de número de inoculaciones, cantidades inoculadas, sangrías parciales efectuadas y tasa de anticuerpos obteni

das en ellas, están resumidas en la Tabla III.

Los datos relativos a la tasa de anticuerpos , con la curva obtenida en el proceso de inmunización, están relacionados en la figura III.4.

Incluimos, también, un esquema relativo a las bandas obtenidas en los Ouchterlony, en la figura III.5. En este sistema se utilizó como inmunosuero el anti A S E, enfrentándolo al antígeno A S E. En este esquema podemos ver cómo obtuvimos cuatro bandas de precipitación en el pocillo correspondiente a la dilución 1/1, continuando tres de ellas, con reacción de identidad en el pocillo correspondiente a la dilución 1/2. Dos de estas bandas continúan en la dilución 1/4, así como en la dilución 1/8. En el pocillo que corresponde a la dilución 1/16, obtuvimos una sola banda de precipitación, que se continúa con otra frente al pocillo con la dilución 1/32.

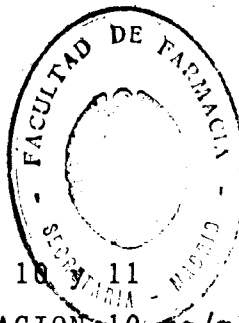
III.2.2. Análisis antigénico directo del *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946.

De igual manera a como lo efectuamos con el *B. sphaericus*, procedimos a la investigación antigénica directa de esta cepa bacteriana.

Las inmunoelectroforesis se realizaron median-

Tabla III. Pauta de inmunización con los antígenos

A S E, A C E y B C E.



PAUTA DE INMUNIZACION

CONEJO N° 72-10 y 72-11

ANTIGENO A.S.E

JAULA N° 10 y 11

CONCENTRACION 10 mg/ml

Fecha	Inoculación N°	Día N°	Cantidad Ag. inoc.	Sangría N°	Tasa Ac. Ouchterlony
	<u>1ª Serie</u>				
	1	1	1 ml	1	
	2	3	"		
	3	5	"		
	4	8	"		
	5	10	"		
	6	12	"		
	7	15	"	2	
	8	17	"		
	9	19	"		
	10	22	"		
	11	24	"		
	12	26	"		
	13	29	"		
	14	31	"	3	1/8
	15	33	"	4	1/16
	<u>2ª Serie</u>				
	16	43	2 ml	5	1/32
	17	45	"		
	18	47	"		
	19	50	"	6	
	20	52	"		
	21	54	"		
	22	57	"	7	
	23	59	"		
	24	61	"		
	25	64	"	8	
	26	66	"		
	27	68	"		
	28	70	"	9	
	29	73	"		
	30	74	"	10	

Fig.III.4.-Curva de la tasa de anticuerpos obtenidos
en la inmunización de los conejos con los antígenos
A S E, A C E y B C E.

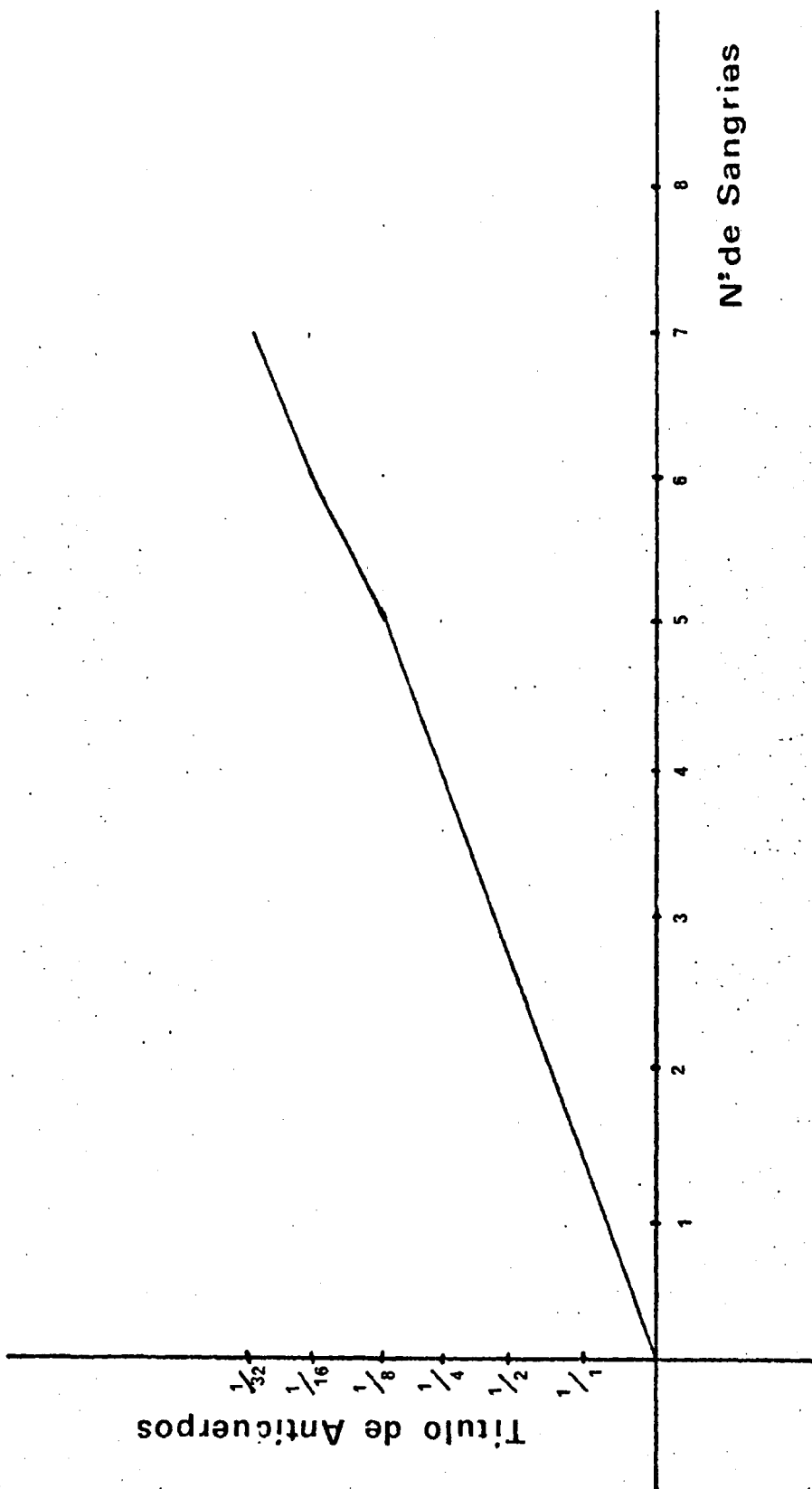


Fig.III.5.-Esquema de los Ouchterlony realizados
enfrentando los antígenos A S E, A C E y B C E a
su inmunosuero homólogo.

$$\frac{1}{4}$$

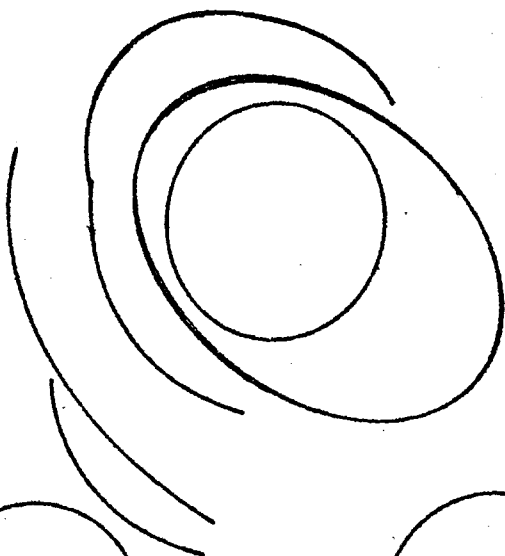
$$\frac{1}{8}$$

$$\frac{1}{16}$$

$$\frac{1}{3}$$

$$\frac{1}{1}$$

$$\frac{1}{2}$$



te el enfrentamiento directo del antígeno A S E con el inmunosuero anti A S E.

El esquema de las bandas de precipitación obtenidas en este sistema está representado en la Fig.

III.3.

Los resultados que obtuvimos los expresamos, igual que en el caso anterior, mediante la movilidad relativa a la albúmina de las bandas de precipitación correspondientes. Estos fueron:

Una banda de precipitación de movilidad -7, difusa, aplanada, con aparición esporádica. Una banda de precipitación de movilidad 29, simétrica, bien marcada, intensa, fina, constante en su aparición. Una banda de movilidad 44, que corta a la anterior, simétrica, intensa, fina, con una constancia total en su aparición. Dos bandas de movilidad 55, paralelas, simétricas, finas, intensas, nítidas, constantes en presencia, que denominaremos 55a y 55b. Dos bandas de movilidad 62, de iguales características a las anteriores y que denominaremos 62a y 62b. Una banda de movilidad 74, aplanada, ligeramente difusa, fina con una frecuencia en su aparición de un 70%. Una banda de movilidad 85, fina, intensa, nítida, simétrica, que aparece constante en todos

los ensayos efectuados.

En resumen, la composición antigénica total de este sistema, obtenida por el enfrentamiento directo del sistema homólogo, fue de 9 bandas de precipitación. Al igual que el caso anterior, luego volveremos a considerar dicha composición antigénica, ya que, a partir de los distintos compuestos planteados, llegamos a la composición teórica total de este complejo antigénico.

III.3. Análisis antigénico directo del B. sphaericus, AT CC 7055, con adición de esteroides.

Partimos, para el estudio de este apartado, de los antígenos obtenidos según describimos en el apartado II.2.2.1., y siguiendo la pauta utilizada con las cepas anteriormente descritas.

III.3.1. Proceso de inmunización de los conejos:

Para el estudio de este sistema se utilizaron los conejos N° 72-7 y 72-8 según la numeración de nuestro archivo de animales. Su peso fue de 4,8 y 4,2 Kg. respectivamente.

La pauta de inmunización, así como todos los datos obtenidos, inoculaciones, concentración del extrac

to antigénico, tasas de anticuerpos obtenidas, etc., fueron totalmente iguales a las obtenidas para el A. simplex sin esteroides, por lo cual nos remitimos a ellos, para evitar repeticiones. Tabla III. y Fig. III.4.

III.3.2. Análisis antigénico del B C E.

Este análisis, de igual manera que los realizados en los sistemas anteriores, fue llevado a cabo mediante la utilización de las técnicas de Inmuno-electroforesis, para la búsqueda de las bandas de precipitación correspondientes al complejo antígeno-anticuerpo, y la inmunodifusión, para controlar las identidades observadas en algunas bandas.

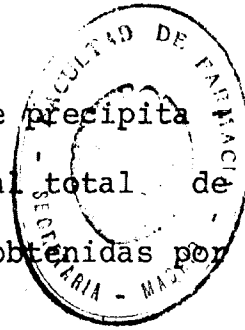
Para ello procedimos al enfrentamiento directo del sistema antígeno B C E frente al inmunosuero anti B-C E. El esquema completo de las bandas obtenidas en este caso, están resumidas en el esquema de la Fig. III.3. c.

Los resultados obtenidos los resumimos, agrupándolos por similitud en la movilidad relativa a la albúmina, dieron los siguientes grupos:

Un grupo de bandas de movilidad comprendida entre 50 y 56, con un total de tres bandas. Un grupo de bandas de movilidad comprendida entre 100 y 109,5, con

un total de cinco bandas.

En total obtuvimos ocho bandas de precipitación en este sistema, que corresponderían al total de bandas de este sistema, B C E/anti B C E, obtenidas por enfrentamiento directo.



También en este caso, como en el de III.1.2., y III.2.2., en que encontramos bandas con la misma movilidad, las distinguimos entre sí mediante la utilización de letras minúsculas, que nos individualizarían estas bandas.

III.4. Análisis antigénico del Arthrobacter simplex, ATCC 6946, con adición de esteroides.

Partimos, para este estudio, de los extractos antigénicos obtenidos en el apartado II.2.2.1., y siguiendo la pauta ya descrita para los demás sistemas.

III.4.1. Proceso de inmunización de los conejos:

Este proceso se realizó de manera similar a la efectuada en el sistema A S E, en que, incluso, se obtuvieron los mismos resultados, tanto en el proceso de inmunización, en que fueron idénticos los datos relativos al número, concentración de los extractos inyec-

tados, como a la tasa de anticuerpos obtenida, por lo que nos remitimos a la Tabla III. y Fig. III.4., para evitar repeticiones.

Los conejos utilizados fueron los N° 72-12, y 72-13, con un peso de 5 y 4,6 Kg.

III.4.2. Análisis antigénico.

Fue realizado mediante la utilización de las técnicas ya descritas de inmunolectroforesis e inmunodifusión, en que obtuvimos los resultados siguientes, también agrupados por zonas de movilidades relativas a la albúmina lo más homogéneas posibles, enfrentando el sistema antígeno A C E, frente al inmunosuero anti A C E. Los resultados los resemimos en el esquema D. de la Fig. III.3.

Un grupo de bandas de precipitación, con movilidades comprendidas entre 50 y 55, con un total de tres bandas.

Una banda de precipitación de movilidad relativa de 73.

Un grupo de bandas de movilidad comprendida entre 106, y 109,5, con un total de dos bandas.

Un grupo de bandas de movilidad comprendida entre 126,6 y 136,6 con un total de dos bandas.

El número total de bandas de precipitación obtenidas por el enfrentamiento directo del sistema A C E/anti A C E, fue de ocho bandas, que consideramos la composición antigénica total de este sistema.

También en este caso obtuvimos bandas con idéntica movilidad, que identificamos con letras minúsculas.

III.5. Estudio de la inducción y represión enzimática.

Como consideraciones iniciales a este apartado de los resultados obtenidos, hemos de exponer las bases teóricas de que hemos partido para la confección del estudio de la dinámica de las enzimas implicadas en la problemática objeto de nuestro trabajo, con las variaciones observadas al realizar los análisis antigénicos correspondientes a los sistemas ensayados, realizando los enfrentamientos que influirían en el cambio de condiciones, a saber, los sistemas cruzados sin esteroides y después de la adición de esteroides.

Hemos construido un modelo directo de la composición antigénica de las cepas empleadas, mediante el enfrentamiento de los antígenos frente a sus propios antisueros. Partiendo de esta base, hemos confeccionado una metodología de trabajo en que podríamos ver qué sistemas son comunes a los dos sistemas, con y sin esteroides, com

ponentes antigénicos inhibidos por la presencia de esteroides, componentes antigénicos inducidos por su presencia, y componentes comunes a ambos sistemas.

Este planteamiento teórico es el mismo para las dos cepas bacterianas empleadas, utilizando las siguientes denominaciones:

Proteínas reprimidas: proteínas presentes en los cultivos sin esteroides y ausentes en los cultivos esteroides.

Proteínas inducidas: aquellas ausentes en el cultivo sin esteroides y presentes en los cultivos con esteroides.

Proteínas no modificadas: aquellas que encontramos en ambos cultivos.

La explicación de estas denominaciones es obvia. Los componentes antigénicos no modificados, estarán presentes en ambos sistemas. Los componentes antigénicos reprimidos por la presencia del sustrato, estarán presentes en el B S E pero ausentes en el B C E. Los componentes inducidos por la presencia del sustrato, estarán presentes en el sistema B C E, pero ausentes del sistema B S E.

El análisis de estos grupos de proteínas lo conseguiremos enfrentando los siguientes sistemas:

A) Para la investigación de los componentes no modificados, enfrentando los sistemas B S E/anti B C E y B C E/anti B S E, entendiendo siempre que colocamos en primer lugar el antígeno y a la derecha de la barra el antisuero correspondiente.

B) Para la investigación de los componentes reprimidos por la presencia del sustrato, se utilizó el sistema B S E/anti B S E (B C E), es decir, mediante la absorción por parte del antígeno con esteroides, de los componentes comunes con el sistema sin esteroides, según explicamos en el apartado II.3.4.

C) Investigación de los componentes inducidos por el sustrato, mediante el enfrentamiento B C E/anti B C E(B S E), en que, por absorción, hemos eliminado del medio, los componentes comunes entre el B C E y el B S E, con lo que sólo quedarían los componentes inducidos en el antisuero B C E.

A partir de estos datos preliminares, podemos ya confeccionar un panorama completo del estudio enzimático de cada sistema, mediante la confección de una Ta-

bla'-resumen que iremos colocando los distintos componentes ordenados en columnas, según su movilidad relativa a la al**u**mina.

Columna N^o. 1, en que irán expresados todos aquellos componentes antigénicos que nos hayan dado bandas de precipitación por el enfrentamiento directo de los antígenos con el inmunosuero correspondiente al sistema contrario, es decir, antígeno B S E frente al inmunosuero anti B C E. Antígeno B C E frente al inmunosuero anti B S E, con lo que obtendríamos la totalidad de componentes comunes en ambos sistemas.

Columna N^o. 2, en que colocamos los componentes reprimidos por la presencia del sustrato esteroide, y que obtuvimos mediante el enfrentamiento del antígeno B C E, frente al inmunosuero anti B S E, absorbido en sus componentes comunes con el antígeno B C E, que nos eliminaría, de dicho inmunosuero, aquellos antígenos compartidos, quedándonos, solamente, los correspondientes a los reprimidos ya que, los inducidos, que también estarían presentes en el antígeno B C E, al no enfrentarse con un inmunosuero que los contenga, no reaccionarían.

Columna N^o. 3, en que expresamos los componentes antigénicos inducidos, obtenidos mediante el enfrentamiento

124

to del antígeno B C E al in^{mu}nosuero anti B C E, absorbido con el antígeno B S E , que eliminaría los componentes co^munes, pero, al no llevar el in^{mu}nosuero los anticuerpos correspondientes a los componentes reprimidos, que sí es^tán en el antígeno B S E, no reaccionarían, manifestándose, solamente, los componentes inducidos.

Columna 4 a 6, en que obtenemos la composición antigénica total del B S E, mediante la deducción teórica mediante, en primer lugar, la composición teórica, columna 4 obtenida por la suma de las columnas 1 y 2, que comprenden los componentes comunes a ambos sistemas, más los correspondientes a los reprimidos, que nos daría el total teórico de los componentes antigénicos. En la columna 5, ponemos los revelados por la reacción directa del sistema homólogo. En la columna 6 obtenemos, por fin, la composición antigénica total, final, del sistema estudiado.

Columna 7 a 9, en que obtenemos los componentes antigénicos totales del sistema B C E, mediante un razonamiento análogo al anterior. Columna 7, en que obtenemos , la composición antigénica teórica del sistema, por la suma de las columnas 1 y 3, una de los componentes comunes, y la otra a los inducidos por la presencia del sustrato. La columna 8, en que obtenemos la composición por enfren-

tamiento directo del sistema homólogo, y la columna 9, en que, por suma de las columnas 7 y 8, obtenemos la composición final del sistema.

III.5.1. Estudio de la inducción y represión enzimática en el *Bacillus sphericus* ATCC 1755.

Expuestas ya las líneas generales de este estudio, pasamos a exponer los resultados obtenidos con cada componente en particular.

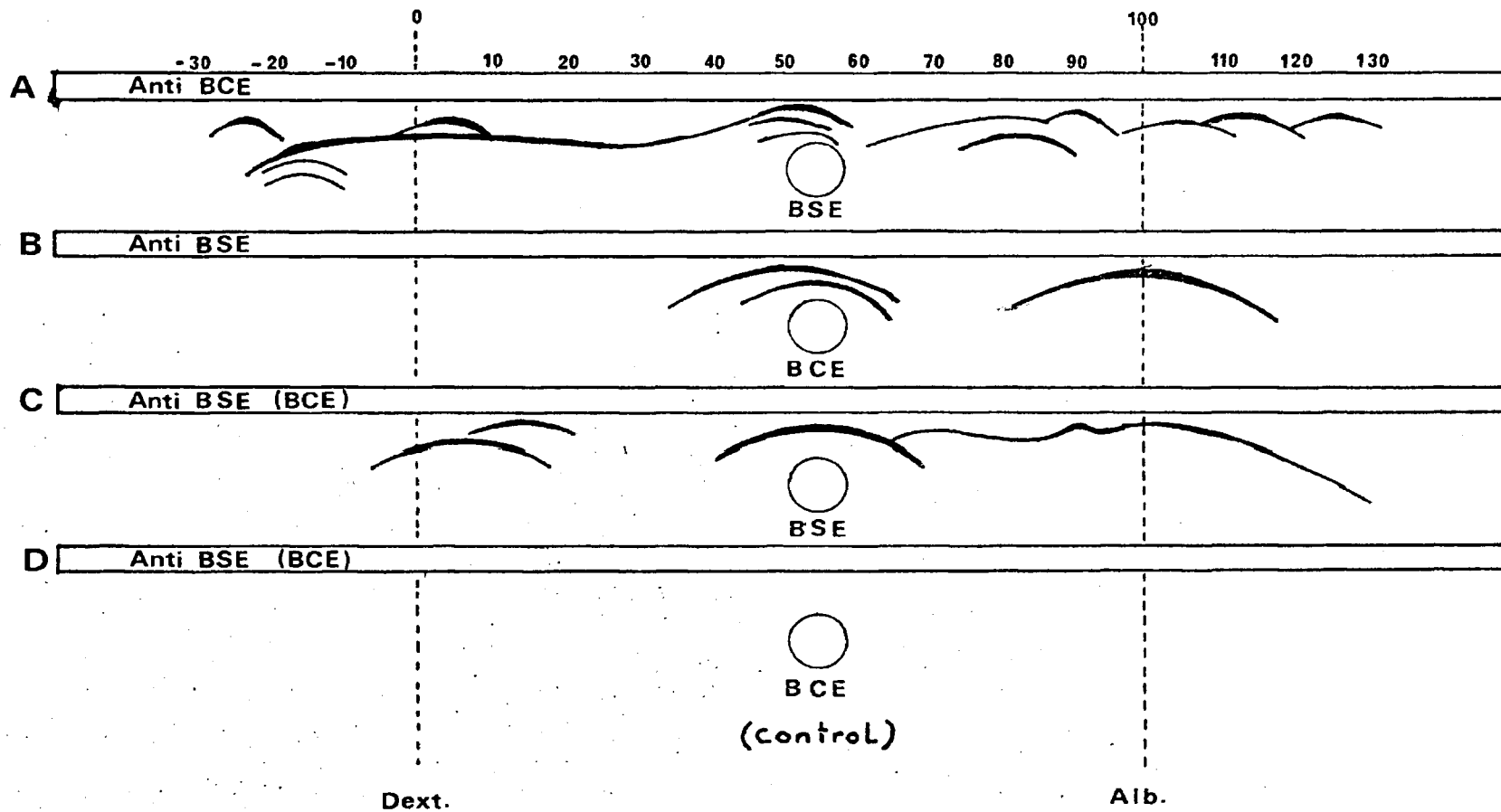
III.5.1.1. Componentes no modificados de los sistemas B S E, y B C E.

Este estudio se realizó mediante el enfrentamiento del antígeno B S E frente al inmunosuero anti B C E y del antígeno B C E frente al inmunosuero B S E. Representado en los esquemas A y B de la Fig. III.6.

Observamos, en este sistema, la aparición de una banda de movilidad -23, ancha, algo difusa, intensa, que parecía continuación de la banda de movilidad 16, y que detectábamos en la totalidad de inmunolectroforesis efectuadas.

Con una movilidad un poco menor, de -15, observamos la aparición de tres bandas -15a, 15b, y -15c, concéntricas, simétricas, pequeñas, finas, muy nítidas e inten

Fig.III.6.-Esquemas representando las inmunolectroforesis realizadas enfrentando ,en A el antígeno B S E frente al inmunosuero anti B C E, en B el antígeno B C E frente al inmunosuero anti B S E, en C el antígeno B S E frente al inmunosuero anti B S E absorbido con el antígeno B C E, en D el antígeno B C E frente al inmunosuero anti B S E absorbido con el antígeno B C E como control de absorción.



sas, y que encontramos en todos los ensayos efectuados.

En algunos casos, nos encontramos con otra banda, de movilidad -10, que nos aparecía esporádicamente, con una frecuencia de un 25%, difusa, poco intensa, simétrica y pequeña.

En la zona de movilidad -3 y 3, encontramos dos bandas, que unas veces aparecían simultáneamente en la movilidad 3 y otras en la la 3 y una en -3. Son unas bandas pequeñas. poco marcadas, concéntricas, simétricas finas y algo difusas.

Encontramos otra banda de movilidad 16, que parecía continuarse con la de movilidad -23, ancha fuerte, sin difusión, algo aplanada, y constante en su aparición.

Sobre la movilidad 50 encontramos un total de tres bandas, dos de 50 y una de 53. Una de las de movilidad 50 fue la única que detectamos con el sistema antígeno B C E frente al inmunosuero anti B S E. De estas bandas, una de ellas rodeaba al pocillo, siendo pequeña, y algo difusa. La otra de movilidad 50 adoptaba una forma de hoz, siendo fina, muy intensa, muy nítida y apareciendo en todos los ensayos efectuados. La de movilidad 53, era mucho mayor, más lejana al pocillo, muy intensa, an

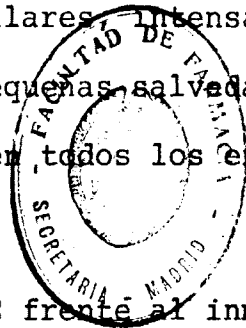
cha, nítida, simétrica y cortaba a la de movilidad 16. La encontramos en todos los ensayos.

Estos datos los resumimos en la columna 1 de la Tabla IV.

Encontramos otra banda de movilidad 56, que solamente aparecía en el enfrentamiento antígeno B C E an tisueno B S E, como una banda de características similares a la de movilidad 53 del sistema inverso, por lo que nos inclinamos a pensar, dado que esta última banda no aparecía en dicho sistema, que eran las mismas, aunque en este caso, era mucho menos intensa y más fina, aunque conservaba la nitidez.

En la zona entre 80 y 90, encontramos un total de tres bandas de precipitación, pero siempre que utilizábamos el antígeno B S E y nunca en el caso inverso. Una banda, la de movilidad 80 tendía a unirse a la de movili dad 50 más alejada del pocillo, en la porción distal del mango de la hoz, siendo cortada, a su vez, por una especie de ramificación que salía de la banda de movilidad 50 más interna. La de movilidad 83 se cortaba con la ban da de movilidad 53, y la de movilidad 90, formaba como un puente de unión entre las bandas de movilidad 106, y 80, tangencialmente a esta última. Las características

morfológicas de estas bandas eran similares, intensas, finas, nítidas, simétricas, con las pequeñas salvedades indicadas, y de aparición constante, en todos los ensayos realizados.



En el sistema antígeno B C E frente al inmuo suero anti B S E, detectamos una banda de movilidad 106. Se trata de una banda muy intensa, fina, nítida, y simétrica y que encontramos constantemente en todos los ensayos, con la salvedad apuntada de su aparición en uno u otro sistema.

Encontramos otras tres bandas de movilidades 113, 116,5 y 126,5., que se tocaban en su extremo proximal, siendo las tres iguales en características, finas, intensas, nítidas, simétricas, aunque con distinto centro, de aparición constante. Sólo las detectábamos al u tilizar el B S E como antígeno. Por lo tanto, el total de bandas encontradas, en este estudio, fue de 19 bandas de precipitación.

III.5.1.2. Componentes ~~Ex~~primidos del Baci - llus sphaericus ATCC 7055.

En el estudio de este sistema utilizamos antígeno del Bacillus sphaericus sin esteroides, que lleva

los componentes totales de la cepa bacteriana, a saber, los no modificados por el sustrato y los reprimidos por su presencia, enfrentado al inmunosuero homólogo, que lleva los mismos componentes, absorbido por el antígeno correspondiente al *Bacillus sphaericus* con esteroides, eliminará los componentes comunes, no modificados, no reaccionando los inducidos, por lo que obtendremos la composición antigénica reprimida por el sustrato en forma de bandas de precipitación. Representado en el esquema C de la Fig. III.6.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes expresados como tales bandas, por su movilidad relativa a la albúmina:

Una banda de precipitación, de movilidad 7, simétrica, constante en su aparición, fuerte, fina, nítida. Una banda de precipitación de movilidad 14, de características similares a la anterior. Una banda de precipitación, de movilidad 55, muy intensa, simétrica, que bordea el pocillo, nítida, fina y de aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de precipitación de movilidad 70, pequeña, gruesa, nítida, intensa, que parecía desgajarse de la anterior, simétrica y constante en su aparición. Una banda de precipita -

ción de movilidad 92, amplia, con tendencia a aplanarse, simétrica, fina, intensa, nítida, de aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de precipitación de movilidad 100, muy intensa, simétrica, con tendencia a curvarse hacia arriba, nítida y de aparición constante en todos los ensayos.

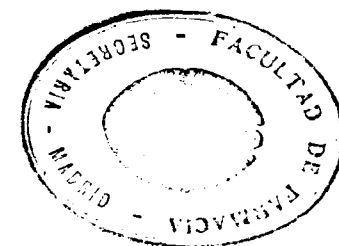
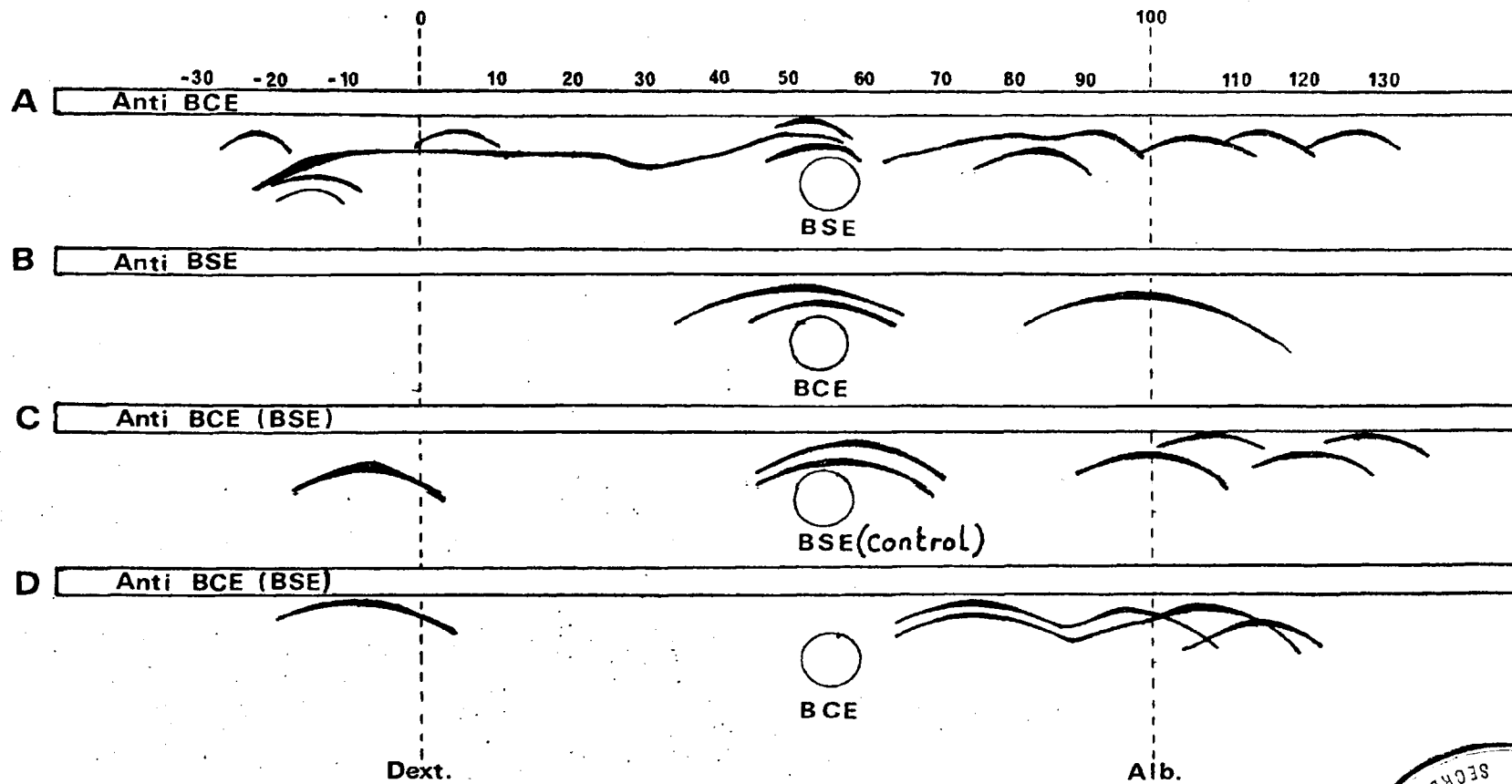
En total se obtuvieron seis bandas de precipitación como composición antigénica reprimida por el sustrato esteroide.

Como control de absorción se utilizó el sistema antígeno B. sphaericus con esteroides, frente al mismo inmunosuero absorbido, en que sólo se obtuvieron unas nubes que corresponderían a las movilidades 92 y 103, por su posición, pero que no podemos considerar como bandas, ya que no eran constantes en su aparición, y solamente, se evidenciaban como una nube dando la impresión de que eran restos de los componentes que no eran totalmente absorbidos del inmunosuero correspondiente, por lo que podemos dar como buena la absorción del sistema.

Este sistema está representado en el esquema D de la Fig. III.6.

III.5.1.3. Componentes inducidos del Bacillus sphaericus ATCC 7055.

Fig.III.7.-Esquema de las inmunolectroforesis realizadas enfrentando los sistemas, en A el antígeno B S E frente al inmunosuero anti B C E, en B el antígeno B C E frente al inmunosuero anti B S E, en C el antígeno B S E frente al inmunosuero anti B C E absorbido con el antígeno B S E como control de absorción, en D el antígeno B C E frente al inmunosuero anti B C E absorbido con el antígeno B S E.



Para este estudio utilizamos el sistema antígeno B C E frente al inmunosuero anti B C E, absorbido con el antígeno B S E, para eliminar dejando libres solamente los inducidos por el sustrato, ya que los reprimidos, que también estarían presentes en el antígeno B S E, no reaccionarían al carecer el inmunosuero utilizado de los anticuerpos correspondientes. Por lo que obtendríamos la composición antigénica inducida como bandas de precipitación. Estos resultados están expuestos en el esquema D de la Fig. III.7.

Los resultados obtenidos son los expuestos en la columna 3 de la Tabla antes mencionada.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Una banda de precipitación de movilidad -11, levemente difusa, un tanto asimétrica, por aplanarse en su centro, poco intensa, de aparición poco frecuente, de un 25% aproximadamente. Dos bandas de precipitación de movilidad relativa de 77, simétricas, concéntricas, finas, intensas, nítidas y de aparición constante. Una banda de precipitación de movilidad 96, intensa, simétrica, fina, nítida, que corta las de movilidades 107, y 114,5. De aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de movilidad 107, de aparición cons-

tante, nítida, fina, simétrica, que forma un arco secante con las bandas anterior y posterior en movilidad. Una banda de movilidad 114,5, de aparición constante, fina, intensa, nítida, simétrica y que se corta con las dos bandas anteriores.

En total se obtuvieron seis bandas de precipitación como componentes antigénicos inducidos.

Como control de absorción utilizamos el sistema antígeno B S E frente al inmunosuero B C E absorbido con el mismo antígeno, que debería darnos una respuesta negativa por eliminación de los componentes comunes, pero observamos la aparición de dos bandas de precipitación, de movilidad -11 y 114,5, iguales a dos de las aparecidas en el estudio de los componentes inducidos, por lo que las eliminamos como tales, y suponiendo que este resultado anómalo, se deba a defectos de absorción aunque insistimos en que siempre que utilizamos como antígeno el correspondiente al B C E, nos hemos encontrado con resultados sorpresa por alguna acción ligada a la presencia del sustrato esteroide, que si bien actúa como un agente inmunizante normal en los conejos, en cuanto realizamos pruebas "in vitro" con él, se comporta de una manera muy extraña, bien porque la reacción

antígeno anticuerpo nos dé un resultado más pobre, o por que la respuesta sea totalmente inesperada. Tenemos la intención de profundizar en el estudio de este fenómeno. Esquema C de la Fig. III.7.

Nos queda, por tanto, como composición antigénica inducida de esta bacteria, un total de cuatro bandas de precipitación, correspondientes a las movilidades 77a, 77b, 96, y 107.

III.5.1.4. Composición antigénica total del *Bacillus sphaericus*, ATCC 7055, deducido de los resultados obtenidos:

Habíamos realizado ya en un apartado anterior, un estudio del contenido antigénico total por enfrentamiento directo del sistema homólogo antígeno B \times E frente al inmunosuero correspondiente. En este apartado, queremos llegar a su composición antigénica total, también, pero deduciéndola a partir de los resultados obtenidos con los distintos supuestos ensayados, con los enfrentamientos descritos y teniendo en cuenta las distintas características de dichos componentes, es decir, los componentes reprimidos y los no modificados.

Volviendo al resumen expuesto en la Tabla IV,

esta composición nos la daría la suma de las columnas 1 y 2 de la mencionada Tabla, con lo que obtendremos la composición teórica total de dicha cepa, en sus componentes antigénicos.

Esta suma total la recogemos en la columna 4 de dicha Tabla, con un total de 25 bandas de precipitación, que nos daría un total teórico.

Esta composición debería ser igual a la detectada por el enfrentamiento directo, expresado en la columna 5 de dicha tabla, en que totalizamos 16 bandas de precipitación, utilizando el sistema homólogo antígeno B S E frente al inmunosuero correspondiente. Vemos, no obstante, que hay una diferencia de 10 bandas, que corresponderían a aquellas comunes con el sistema con esteroides, que podría haber influido en su revelado, así como a unas bandas, las de movilidad 6a y 6b, 73, 93 que solamente fueron detectadas mediante el sistema homólogo, mientras que la deducción teórica obtuvo más bandas en zonas que este sistema homólogo dió un número relativamente corto de ellas, Así nos encontramos con que las bandas de movilidad 7 y 14 las encontramos entre las reprimidas con la presencia del sustrato, pero no las detectamos directamente. La banda 16 apareció en

el sistema cruzado, como no modificada por el sustrato. Las bandas 53, y 56, las detectamos también en el enfrentamiento cruzado. La banda 55, la encontramos entre las reprimidas. Las bandas 80 y 86 las encontramos en los enfrentamientos cruzados. La banda 92 la encontramos entre las reprimidas, de la misma forma que la 100.

La composición antigénica total de este sistema, la obtuvimos por la suma de las columnas 4 y 5 de la mencionada Tabla, encontrando un total de 31 bandas de precipitación, que consideramos el total de componentes antigénicos del sistema detectados en nuestros experimentos.

III.5.1.5. Composición antigénica total del *Bacillus sphaericus* ATCC 1055, con esteroides, deducidos de los resultados anteriores.

Conocida ya la composición antigénica total de este sistema, mediante el enfrentamiento directo del sistema homólogo, descrita en el apartado III.3.2. quisimos llegar a la deducción teórica final de este sistema, basándonos en los resultados obtenidos en los distintos enfrentamientos efectuados, con la caracterización de los distintos sistemas implicados en la transformación del sustrato utilizado.

A partir de aquellos datos queremos llegar a una composición que incluya todos los componentes, ya sean no modificados, como inducidos por la presencia del sustrato. Como es obvio suponer, esta deducción teórica, nos permitirá encontrar componentes que puedan enmascarse en la búsqueda directa, máximo teniendo en cuenta la pobreza de respuesta obtenida siempre que se utilizaba como antígeno uno proveniente de una cepa con esteroides.

En el análisis directo de este sistema nos encontramos con un total de ocho componentes antigénicos, expuestos en la columna 7 de la tan repetidamente mencionada Tabla IV.

En la deducción teórica de los mencionados componentes, nos encontramos, sin embargo, con un total de 23 bandas de precipitación. A esta cifra se llegó por la suma de las bandas correspondientes a las columnas 1 y 3 de dicha Tabla, que incluye los componentes no modificados y los inducidos. Como vemos hay una diferencia importante en el número de bandas, 8 en total, lo que está de acuerdo con lo que habíamos observado en la pobreza de respuesta en cuanto al número de bandas de precipitación con este sistema.

Tabla IV.-Recoge la composición antigénica total del B.sphaericus, expresando en la columna 1 los componentes no modificados, en la columna 2 los componentes reprimidos, en la columna 3 los componentes inducidos, en la columna 4 la composición antigénica teórica del B S E. En la columna 5 la composición directa del mismo sistema B S E, en la columna 6 la composición antigénica final del sistema B S E. En la columna 7 los componentes antigénicos teóricos del B C E, en la columna 8 los componentes directos del B C E, en la columna 9 la composición final de dicho sistema.

Movilidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9
-23	x			x		x	x		x
-15	x			x		x	x		x
-15	x			x		x	x		x
-15	x			x		x	x		x
-10	x			x	x	x	x		x
- 3	x			x	x	x	x		x
3					x	x			
3	x			x	x	x	x		x
6					x	x			
6					x	x			
7		x		x		x			
14		x		x		x			
16	x			x		x	x		x
50	x			x	x	x	x	x	x
50	x			x	x	x	x	x	x
53	x					x	x		x
55		x		x		x			
56	x			x		x	x	x	x
70		x		x		x			
73					x	x			
77			x				x		x
77			x				x		x
80	x			x		x	x		x
83	x			x		x	x		x
90	x			x	x	x	x		x
92		x		x		x			
93					x	x			
96			x		x	x	x		x
100		x		x		x		x	x
106	x			x	x	x	x	x	x
106								x	x
106								x	x
107			x				x		x
109,5								x	x
113	x			x	x	x	x		x
116,5	x			x	x	x	x		x
126,5	x			x	x	x	x		x

En el enfrentamiento directo del sistema homó-
logo, las bandas comienzan a aparecer en la zona de mo-
vilidad 50, mientras que en esta deducción encontramos
como zonas más características, las correspondientes a
-23 has -15, con un total de cuatro bandas y desde -10
a 3, con un total de cuatro bandas, no detectadas direc-
tamente.

Hay otra banda de movilidad 53, también fue
detectada, solamente de esta forma.

Otras bandas, de movilidad 80, 83, y 90, sólo
fueron detectadas por enfrentamiento cruzado.

De igual forma fueron detectadas las bandas
correspondientes a las movilidades 106, 113, 116,5 y
126,5.

De todos estos datos obtenemos una composi-
ción antigénica total para el sistema B C E, mediante
la suma de las columnas 7 y 8 de 29 bandas, expuestas
en la columna N° 9 de la Tabla IV.

III.5.2. Estudio de la represeión e inducción enzi-
mática en el *Arthrobacter simplex* ATCC 6946.

De igual forma que procedimos en el estudio
de la dinámica de los sistemas enzimáticos en el Baci -

llus sphaericus, procedimos con el *Arthrobacter simplex*.

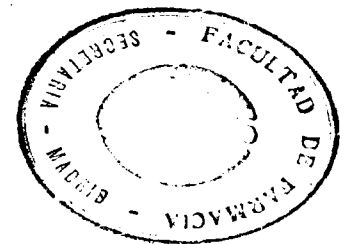
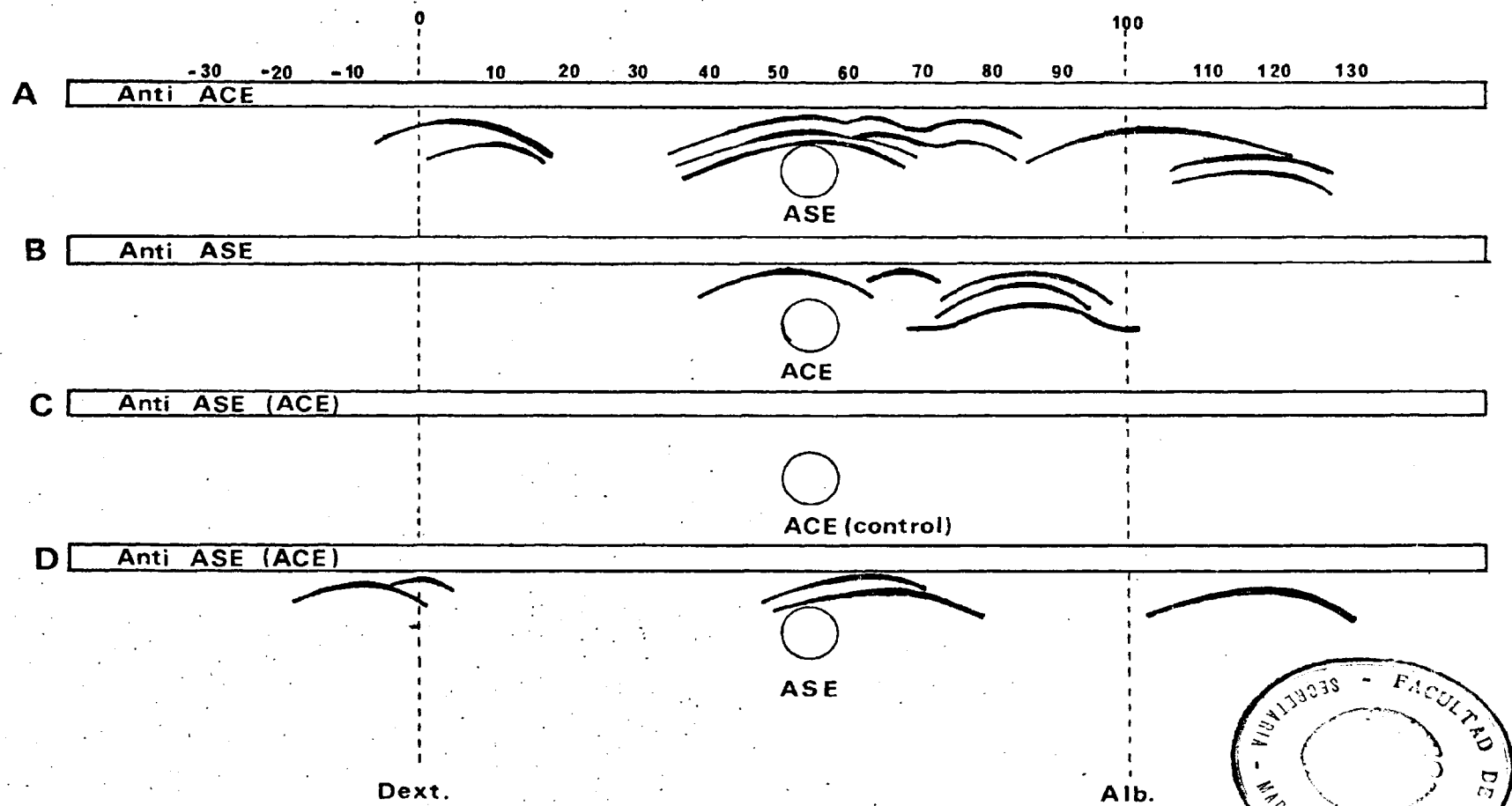
III.5.2.1. Componentes no modificados en los sistemas A S E y A C E.

Este estudio se realizó mediante el enfrentamiento directo de los sistemas antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E y el antígeno A C E frente al inmunosuero anti A S E. Está representado en el esquema A, y B, de la Fig. III.8.

Los resultados obtenidos, agrupándolos por su movilidad relativa a la albúmina, por zonas lo más homogéneas posibles, expresándolos en bandas de precipitación, tal como hemos venido haciendo hasta ahora, fueron los siguientes:

Dos bandas de movilidad 7 y 11, siendo de diferentes características entre sí. Su frecuencia de aparición era similar, ya que las detectamos en todas las inmunoelectroforesis efectuadas, con una constancia del 100%. Su aspecto ofrecía algunas diferencias, ya que la banda de movilidad 7, era aplanada, intensa, nítida, fina, que se prolongaba hasta su contacto con la inferior de movilidad 55, a la que cortaba en algunas ocasiones. Por su parte, la de movilidad 11, era de un radio peque-

Fig.III.8.-Esquema de los enfrentamientos inmuno-electroforéticos de, en A el antígeno A S E frente al inmnuero anti A C E, en B el antígeno A C E frente al inmunosero anti A S E, en C el antígeno A C E frente al inmnuero anti A S E absorbido con el antígeno A C E como control de absorción, en D el antígeno A S E frente al inmunosero anti A S E absorbido con el antígeno A C E.

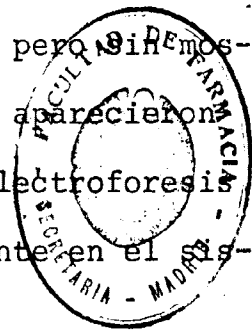


ño, muy marcada, más ancha, pero sin difusión, nítida por tanto y que no contactaba con ninguna otra banda.

Un grupo de bandas de movilidad 55. Tres en total, apareciendo una de ellas en ambos sistemas de enfrentamiento, mientras que las otras dos sólo las detectamos en el sistema antígeno A S E, frente al inmunosuerro anti A C E. Las tres bandas las diferenciamos con letras minúsculas. Las características que presentaron fueron similares, ya que eran muy intensas, simétricas, concéntricas, anchas pero nítidas. Su frecuencia de aparición era de un 100% para las 55a, 55b, y 55c, en el sistema antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E, mientras que la 55c era la única que aparecía en un 100% en el sistema antígeno A C E frente al inmunosuerro anti A S E, apareciendo las 55a, y 55b, de forma esporádica en este sistema.

Un grupo de bandas de movilidad relativa entre 62 y 68, con un total de tres bandas. Estas bandas presentaban diferencias entre sí, ya que la de movilidad 68, sólo se detectó en el sistema antígeno A C E frente al inmunosuero anti A S E. Estas bandas, intensas, anchas, bien marcadas, nítidas, simétricas, eran tangentes a la 55c, con la que parecían continuar, confundiéndose.

dose en una banda común, mucho más ancha, pero si demostramos-
trar difusión. Las bandas de movilidad 62 aparecieron
con una frecuencia del 90% en las inmunolectroforesis
efectuadas. La de movilidad 68 era constante en el sis-
tema en que aparecía.



Dos bandas de movilidad relativa de 77, que a
parecían solamente en el sistema antígeno A S E frente
al inmunosuero anti A C E, con una constancia de un 98%
en su aparición. Eran unas bandas pequeñas, rodeando al
pocillo central, finas y algo difusas, ligeramente asi-
métricas, pero claramente visibles.

Tres bandas de movilidad relativa de 85, que
aparecían solamente en el sistema antígeno A C E frente
al inmunosuero anti A S E, bandas con una tendencia a
aplanarse, algo difusas, asimétricas, con una voluta en
su extremo proximal, que hacían recordar un poco el as-
pecto de una hoz. No eran concéntricas, sino con distin-
to centro aunque de un radio similar, lo que les daba
un aspecto de aspas, Eran intensas, no muy anchas pero
nítidas:

Una banda de movilidad relativa de 107, que
aparecía solamente en el sistema antígeno A S E frente

al inmunosuero anti A C E, difusa, asimétrica, convexa, con una presentación irregular en su frecuencia, que era de un 40%.

Dos bandas de movilidad 118, más nítidas que la anterior, pero de presentación irregular, ya que unas veces aparecía una sola y otras las dos, con una frecuencia de aparición de un 60% una sola y de un 30% las dos simultáneamente. Fueron simétricas, no difusas, bien destacadas, aunque de no mucha intensidad. Aparecían solamente en el sistema antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E.

En total se obtuvieron, como bandas de precipitación comunes en ambos sistemas, un total de 16 bandas de precipitación. Estas bandas son las que están representadas en la columna 1 de la Tabla V.

III.5.2.2. Sistemas reprimidos del Arthrobacter simplex.

Este estudio lo realizamos mediante el enfrentamiento del antígeno A S E al inmunosuero A S E, absorbido en sus componentes comunes con el antígeno A C E, que llevaría consigo los componentes comunes e inducidos, que los restaría del inmunosuero original, dejando en libertad los componentes no comunes, que corresponde

rían a los reprimidos por la presencia del sustrato es
teroide. Representado en el esquema D de la Fig. III.8.

Los resultados obtenidos en el enfrentamien-
to de este sistema expresados como bandas de precipita-
ción por su movilidad relativa a la albúmina, fueron
los siguientes:

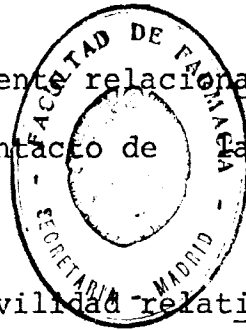
Una banda de precipitación de movilidad rela-
tiva de -7, muy nítida, fina, alargada, con aspecto de
una S estilizada, sin difusión, con una constancia en
su aparición de un 100%.

Una banda de precipitación de movilidad rela-
tiva de 0, similar a la anterior en su aspecto de S a-
largada, con la que se cruza en su extremo distal, fi
na, nítida, fuerte, y con una constancia del 100% en su
aparición.

Una banda de precipitación de movilidad rela-
tiva de 62, que partía del pocillo central, con una
constancia del 100% en su aparición, nítida, fuerte, fi
na, asimétrica, con el aspecto de una hoz, con su man-
go en la porción distal.

Una banda de precipitación de movilidad rela-
tiva de 70, paralela a la anterior, con una constancia
también de un 100%, con las mismas características de

aspecto, y con la que parece estar íntimamente relacionada, ya que se observaron unas líneas de contacto de una a la otra.



Una banda de precipitación de movilidad relativa de 118. Constante en su aparición, un 100%, simétrica, nítida, pequeña, muy intensa, sin difusión.

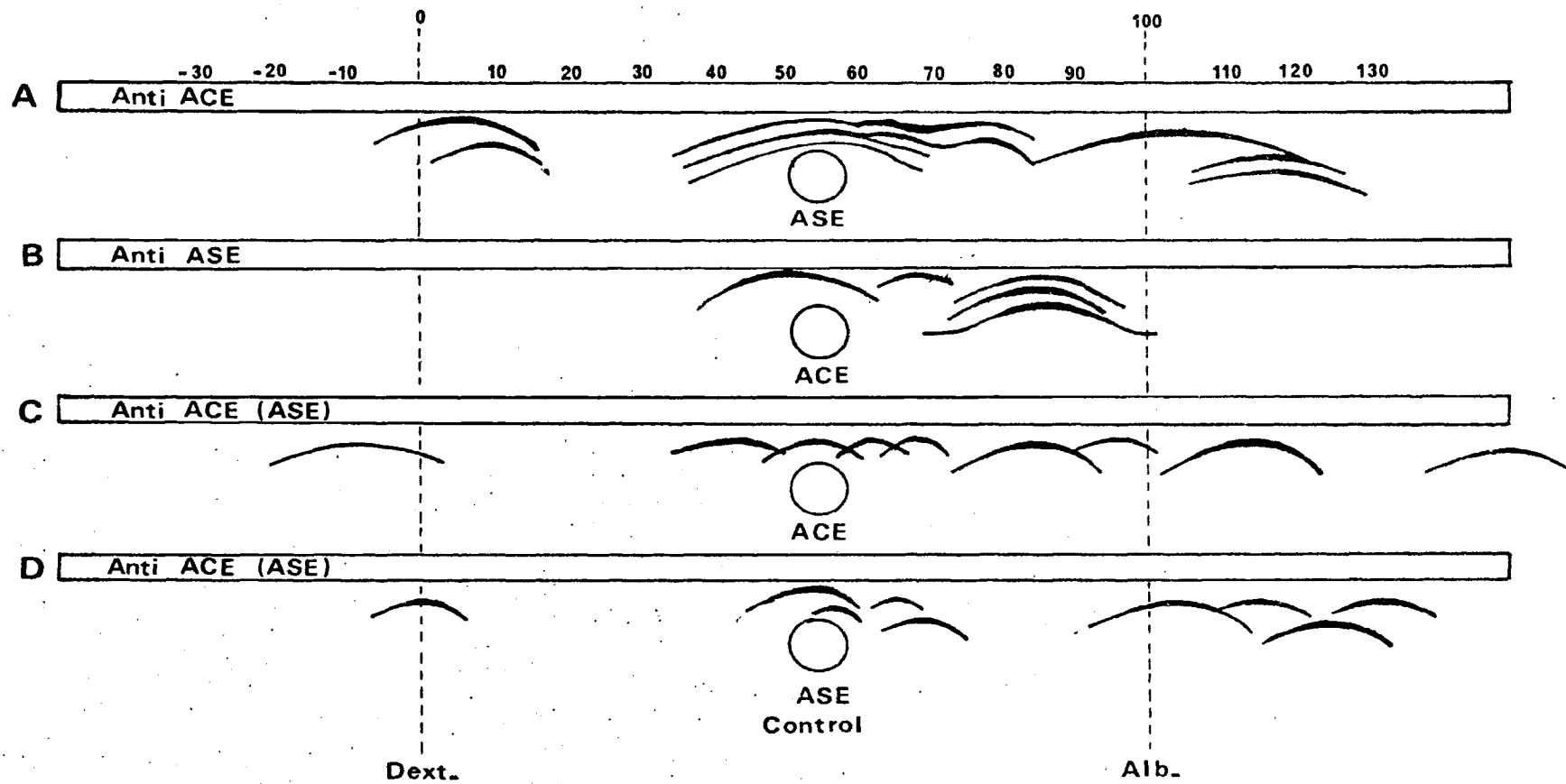
En total se encontraron cinco bandas de precipitación correspondientes a este apartado. Esta composición antigénica consideramos que corresponde a la total de componentes reprimidos por la presencia del sustrato esteroide.

Como control de absorción utilizamos el sistema antígeno A C E frente al inmunosuero anti A S E, absorbido con el antígeno A C E, que no dió ninguna banda de precipitación, lo que nos demuestra que hubo una absorción total. Esquema C de la Fig. III.8.

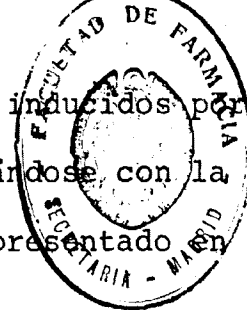
III.5.2.3. Sistemas inducidos del *Arthrobacter simplex*.

Este estudio se realizó mediante el enfrentamiento del sistema A S E, con lo cual, al llevar este antígeno los componentes antigénicos comunes y reprimidos, los eliminaría del inmunosuero anti A C E, con lo que

Fig.III.9).-Representa los enfrentamientos inmuno-electroforéticos siguientes: en A el antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E, en B el antígeno A C E frente al inmunosuero anti A S E, en C el antígeno A C E frente al inmunosuero anti A C E absorbido con el antígeno A S E, en D el antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E absorbido con el antígeno A S E como control de absorción.



nos quedarían solamente los componentes inducidos por la presencia del sustrato esteroide, revelándose con la inmunolectroforesis del sistema. Está representado en el esquema C de la Fig. III.9.



Los resultados obtenidos, expresados como bandas de precipitación, según su movilidad relativa a la albúmina, fueron los siguientes:

Una banda de precipitación de movilidad -10, que aparecía con una frecuencia relativamente baja, de un 30% en las inmunolectroforesis efectuadas. Se trata, de una banda muy pequeña, muy fina, pero muy intensa y nítida. Simétrica.

Una banda de precipitación de movilidad 44, muy frecuente, el 80% de los ensayos efectuados. Una banda muy nítida, muy intensa, simétrica, que se continúa, con una guirnalda, con la banda de movilidad 70, sin solución de continuidad.

Una banda de movilidad 55, paralela a la anterior, nítida, fuerte, que se continúa, sin solución de continuidad hacia la banda de movilidad 62. Su frecuencia fue muy grande, de un 90%.

Una banda de movilidad 70, que parece continua

ción de la banda de movilidad 40, ensanchándose, haciéndose mucho más intensa, y más ancha, pero sin difusión, curvándose violentamente hacia arriba.

Una banda de movilidad 85, que también parece ser continuación, o nacer de la anterior, hacia el punto 65, mucho más intensa y con una pendiente muy fuerte en su porción distal. Muy marcada. A partir de ellas se destacaba la aparición de una banda, de una intensidad superior aún, la más intensa de las bandas que aparecieron en este sistema, cuya movilidad fue, en unos casos de 96, y en otros de 100, con una pendiente muy acusada. Se trata de una banda ancha, nítida, parabólica, que entra en todos los inmunolectroforesis realizadas con este sistema, y que suponemos la misma.

Esporadicamente se detectó una banda, de movilidad 107, fina, nítida, aunque poco intensa, simétrica. Se encontró con una frecuencia de un 20%.

Otras dos bandas se encontraron con movilidad relativa aún superior, pero con una frecuencia baja, de un 15%. Bandas anchas, en tanto difusas, ligeramente asimétricas, con una movilidad de 114,5 y de 150.

En total se encontraron, como componentes in-

ducidos del *Arthrobacter simplex*, un total de 12 bandas si se consideran distintas las de movilidad 96 y 100, o de once, si, como suponemos, son las mismas bandas estas dos, por la similitud que presentan en su aspecto y que la presencia de una, excluye a la otra ya que nunca se encontraron simultaneamente.

Como control de absorción se utilizó el sistema antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E, absorbido con este antígeno, A S E, y obteniéndose cuatro bandas de precipitación, de movilidades 59, 70, 107, y 125, por lo que eliminamos del sistema de componentes inducidos las bandas de precipitación similares o iguales, por lo que excluimos de esta consideración, componentes antigénicos inducidos, las bandas de movilidad 62, por similitud con la de 59, la banda de 70, por ser la misma, la de 107, por idéntica razón y la de 150, por suponer que la que nos daba 125, era por poca emigración en la electroforesis del componente común, con lo que nos quedaría como composición antigénica inducida, un total de ocho bandas de precipitación: -10, 44, 55, 66, 85,96, y/o 100 y 114,5, que nos daría, además, como veremos al estudiar la composición antigénica total del A S E, una gran concordancia con estos resultados, al no

157
encontrar sino dos bandas comunes con el sistema original de *Arthrobacter* sin esteroides.

III.5.2.4. Composición antigénica total del *Arthrobacter simplex* ATCC 6946.

En un apartado anterior habíamos llegado a un resultado con respecto a este punto, mediante el enfrentamiento directo del antígeno A S E con el inmunosuero homólogo. En este apartado queremos llegar a la misma conclusión mediante la deducción de los componentes a partir de los resultados obtenidos en los enfrentamientos descritos en los apartados inmediatamente anteriores, mediante la composición de un cuadro antigénico total, teniendo en cuenta las condiciones de sistemas antigénicos no modificados, o constitutivos del *Arthrobacter* sin esteroides y, los componentes reprimidos por la presencia del sustrato, lo que nos daría, desde un punto de vista secuencial, la composición antigénica total de esta cepa bacteriana.

Volviendo al resumen expuesto en la Tabla V., esta composición viene expuesta por las bandas correspondientes a las columnas 1 y 2, cuya suma nos daría la composición teórica total de los componentes antigénicos.

Así nos encontramos, columna 4 de dicha Tabla, con un total de 19 bandas de precipitación, a las cuales hay que añadir aquellas, no detectadas por este procedimiento, que lo hubiesen sido mediante el enfrentamiento directo del sistema homólogo, para obtener la composición antigénica total del sistema.

De esta forma nos encontramos, columna 5 de la mencionada Tabla, con un total de 9 bandas.

A esta diferencia de diez bandas corresponden las de movilidades 29,44, y 74. De ellas, la de movilidad 29 se detectó solamente en el enfrentamiento directo del sistema homólogo, A S E , siendo una banda bien caracterizada, intensa, nítida, fina, simétrica y con una constancia total en su aparición, con un 100% de frecuencia en todas las inmunolectroforesis efectuadas, que corta a la de movilidad 44. La de movilidad 44 nos aparecía tanto en el enfrentamiento del sistema homólogo, como en el enfrentamiento del antígeno A C E con el inmunosuero absorbido anti A C E con el antígeno A S E, estando descrita entre las inducidas, de las que la tenemos que eliminar, ya que, al aparecer entre las directas del sistema homólogo sin esteroides, podemos considerar que se debe su aparición a un defecto de absorción del inmunosue-

ro anti A C E por el antígeno A S E. La banda de movilidad 74 nos apareció también en el enfrentamiento directo del sistema homólogo con esteroides, con idénticas características morfológicas y de frecuencia de aparición, por lo que podemos considerarlo como correspondiente a un componente antigénico común.

Sin embargo, aunque por estas características podemos considerarla común a ambos sistemas, no nos aparecían bandas con esta movilidad en el enfrentamiento de los sistemas A S E y A C E cruzados, sino una banda de movilidad 77, con idénticas características, por lo que nos inclinamos a pensar que se trata de la misma banda, que, en unos casos se revela como de movilidad 74 y en otros de movilidad relativa 77.

Las demás bandas que detectamos solamente por deducción teórica corresponden a bandas de movilidad 0,7 y 11, dentro de la zona lenta, detectadas, bien por los enfrentamientos cruzados, o entre las reprimidas. Otra banda nueva es la 55 c. que sólo se detectó de manera cruzada, al igual que la de movilidad 68. Lo mismo nos sucedió con la de movilidad 70. Dentro del grupo de movilidad 85, encontramos dos nuevas, las 85b y 85c. También detectamos de forma cruzada las más lentas, de

movilidad 107, 118a y 118b.

El resumen del total de bandas correspondientes al *Arthrobacter simplex* sin esteroides, lo reflejamos en la columna 6 de la Tabla V, con un total de 22 bandas de precipitación.

III.5.2.5. Composición antigénica total del *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946, con adición de esteroides .

En un apartado anterior habíamos descrito la composición antigénica total de este sistema, a la que llegábamos por enfrentamiento directo del sistema homólogo antígeno A C E frente al inmunosuero anti A C E. Tal como expresamos allí, apartado III.4., encontramos un total de ocho bandas de precipitación, resumidas en la columna 8 de la Tabla V.

En este apartado lo que pretendemos es llegar a la composición antigénica total del sistema A C E, pero partiendo de los resultados que hemos ido obteniendo en la búsqueda de los componentes no modificados, inducidos y reprimidos por la presencia del sustrato esteroide.

Como es obvio, esta composición, deducida de esta manera, será mucho más compleja, ya que incluimos

de esta forma componentes que sólo se revelarían en la presencia del esteroide inductor, que no estarían en la composición primitiva, por tanto, y de otros componentes, que por diversas circunstancias, puedan enmascarse en el análisis directo, caso mencionado de la pobreza de respuesta que siempre obtuvimos al utilizar como antígenos aquellos procedentes de los cultivos bacterianos adicionados de esteroides.

Así nos encontramos que la composición antigénica completa, teórica, del *Arthrobacter simplex*, con esteroides, sería la suma de los componentes comunes, con el A S E, revelados por el enfrentamiento de los sistemas antígeno A S E frente al inmunosuero anti A C E y el compuesto por el antígeno A C E frente al inmunosuero anti A S E, columna 1 de la mencionada Tabla, más los componentes inducidos por el sustrato, revelados por el enfrentamiento del antígeno A C E frente al inmunosuero anti A C E, absorbido de los componentes comunes con el antígeno A S E, tal como expusimos en el apartado III.5.2.3.

Los resultados obtenidos, columna 7 de la Tabla V, fueron un total de 24 bandas de precipitación.

Vemos que hay una gran diferencia en el número

ro de bandas, 16 en total, lo que corrobora lo dicho an
teriormente, sobre la pobreza de respuesta al utilizar,
como antígeno, el proveniente del cultivo con esteroi-
des, hecho en el que pensamos profundizar en la búsquea
da de las posibles explicaciones de este fenómeno ines-
perado. Las zonas de resultado más dispares fueron, princi
palmente, las de movilidades más bajas, desde -10 hasta
44, en que no obteníamos respuesta en el enfrentamiento
directo. La zona de los 62 a 70 de movilidad. La zo-
na de 85 de movilidad, en que nos sucedía lo mismo, y
las de movilidad próxima a 118, en que obteníamos los
mismos resultados. Las restantes zonas de bandas de preci
pitación eran similares en cuanto a movilidades, pero
siempre, mucho más rico en respuesta, en forma de banda
s de precipitación., en el sistema indirecto o teórico
de llegar a la composición total.

Observamos más concordancia manifiesta en la
detección de los componentes inducidos entre el enfren-
tamiento directo del sistema y la deducida por el en-
frentamiento previa absorción, en las zonas de movili-
dades cercanas a 50, 70, 107, y 150, pero no en las co-
rrespondientes a otras zonas de movilidades.

La composición antigénica total, deducida me-

Tabla V.-Recoge la composición antigénica del A. simplex, detallada por conceptos en las diferentes columnas. En la columna 1 componentes no modificados, en la columna 2 componentes reprimidos, en la columna 3 componentes inducidos, en la columna 4 composición teórica del A. simplex sin esteroides en la columna 5 composición directa del A S E, en la columna 6 composición final del A S E, en la columna 7 composición teórica del A C E, en la columna 8 composición directa del A C E, en la columna 9 la composición final del sistema A C E.

[illegible]

diante la suma de las bandas obtenidas por el método directo y el teórico, columnas 7 y 8 de la Tabla, nos da un total de 29 bandas de precipitación, que llamamos composición final, recogida en la columna 9.

Como comprobación observamos que no se detectó ninguna banda de precipitación de las que habíamos encontrado como reprimidas por la presencia del sustrato esteroide, mediante el enfrentamiento directo, aunque sí en las obtenidas por absorción, las de movilidad 62,70 y una de 118.

III.5.3. Análisis antigénico cruzado de *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 y *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946.

Como complemento al estudio de la dinámica de los sistemas implicados en la transformación microbiana de esteroides, suponíamos, en el planteamiento de este trabajo, la posibilidad de que algunos de estos sistemas pudiesen tener algunos componentes comunes, bien en la composición original de las cepas bacterianas, en este caso podrían existir algunos componentes reprimidos por la presencia del sustrato esteroide, o en la presencia de sistemas enzimáticos nuevos originados por inducción debida a la presencia del sustrato añadido.

De la misma forma que para el estudio de cada

cepa bacteriana en particular, en este estudio procedi^{mos} al enfrentamiento cruzado de los distintos supuestos que podrían revelarnos la existencia de comunidad antigénica, tanto entre los componentes no modificados como en los sistemas reprimidos e inducidos por la presencia del sustrato.

Los enfrentamientos que utilizamos fueron los siguientes:

Antígeno B S E frente al inmunosuero anti A S E y antígeno A S E frente al inmunosuero anti B S E, para ver la posible comunidad antigénica entre ambas cepas bacterianas.

En la búsqueda de componentes reprimidos, los sistemas antígeno A S E frente al inmunosuero anti B S E absorbido con el antígeno B C E y el antígeno B S E frente al inmunosuero anti A S E absorbido con el antígeno A C E, con la finalidad, en ambas absorciones de eliminar aquellos componentes antigénicos comunes e inducidos, que nos dejarían libres los reprimidos que serían los que reaccionasen.

En la búsqueda de componentes inducidos empleamos los enfrentamientos antígeno A C E frente al inmunosuero anti B C E, absorbido con el antígeno B S E

frente al in^{mu}nosuero anti A C E absorbido con el antí^geno A S E, con la finalidad en ambos sistemas de eli^{mi}nar los componentes comunes, que serían los corres⁻pondientes a los no modificados y reprimidos por la presencia del sustrato esteroide.

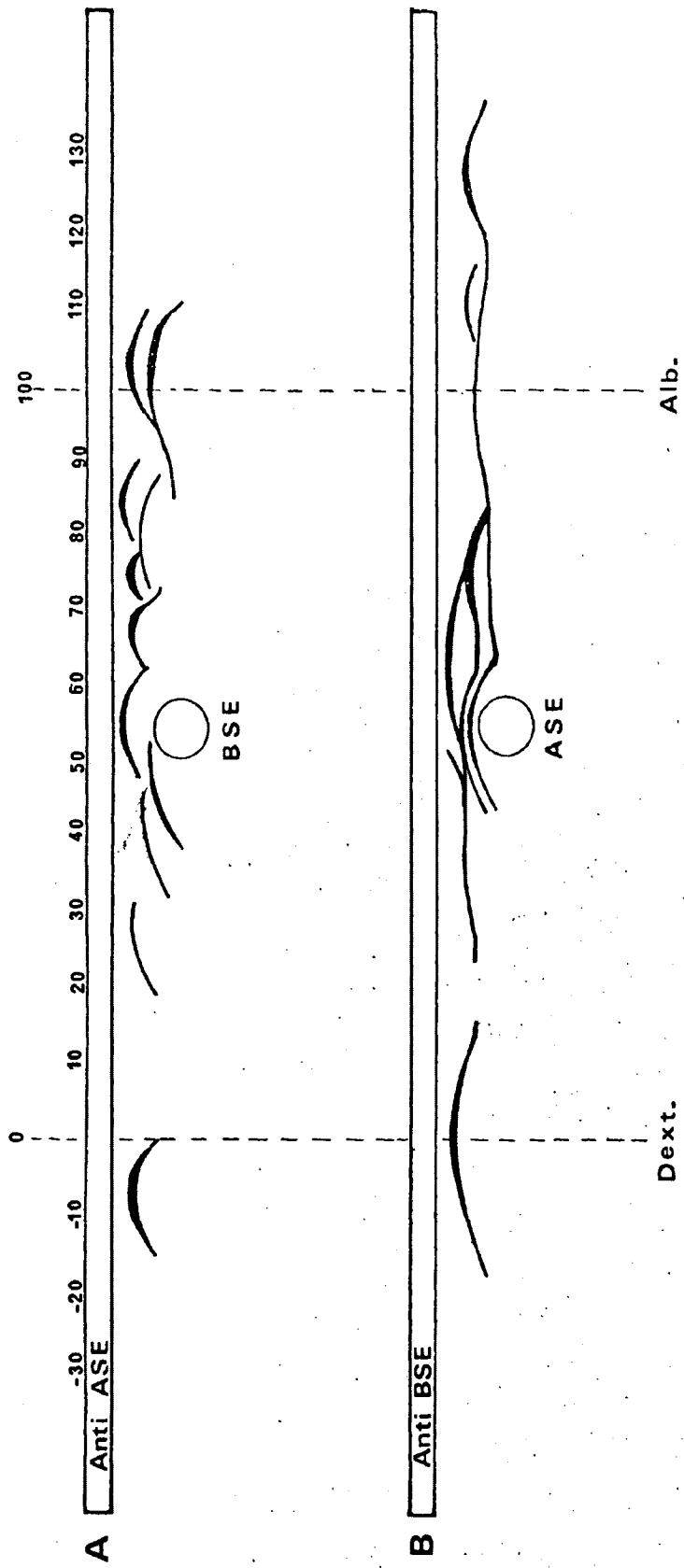
También, en este caso, confeccionamos una Ta^{bla} resumen, en que exponemos las bandas que hallamos en los distintos enfrentamientos, ordenadas por su mo^{vi}lidad relativa a la albúmina y por el sistema a que corresponden.

III.5.3.1. Componentes comunes directos al B. sphaericus y A. simplex.

En la realización de este supuesto partimos del enfrentamiento directo del antí^geno correspondiente a una cepa con el in^{mu}nosuero correspondiente de la otra. Así enfrentamos el antí^geno B S E frente al in^{mu}nosuero anti A S E y el antí^geno A S E frente al in^{mu}nosuero anti B S E, con el objeto de conseguir una ma^{yo}r eficacia en dicho análisis, evitando enmascaramien^{to} de bandas de precipitación y la mayor reproductibi^{li}dad en los resultados. Representados en la Fig. III. 10.

Los resultados obtenidos en este apartado, ex

Fig.III.10.-Representa los enfrentamientos inmuno-
electroforéticos cruzados entre A S E y B S E.



presados como bandas de precipitación por su movilidad relativa a la albúmina, fueron los siguientes:

Una banda de precipitación de movilidad -7, muy intensa, fina, nítida, simétrica y de aparición constante en todos los ensayos efectuados pero siempre en el sistema B S E/anti A S E y no en el inverso.

Una banda de precipitación de movilidad 0, larga, aplanada, no muy intensa, aunque nítida y fina que parecía continuarse con la banda de movilidad 37 . Apareció en todos los enfrentamientos A S E/anti B S E, pero no la detectamos en el enfrentamiento inverso.

Una banda de precipitación de movilidad 25, que nos aparecía en el sistema B S E/anti A S E, constantemente y no en el sistema inverso, pequeña, intensa, fina, nítida, simétrica.

Una banda de precipitación de movilidad 37 , que parecía continuación de la de movilidad 0 y que sólo la detectamos, al igual que esta otra, en el sistema A S E/anti B S E, larga, con tendencia a aplanarse, más intensa que la de movilidad 0, fina, nítida, y que parecía continuarse con la de movilidad 66.

Una banda de precipitación de movilidad 42,

que obtuvimos constantemente en el sistema B S E/ anti A S E, pero no en el otro sistema, que contactaba y se continuaba con la de movilidad 53. Era una banda intensa, nítida, fina, simétrica.

Una banda de movilidad 46, también perteneciente, como la anterior al sistema B S E/anti A S E, que parecía desgajarse de esta otra banda a partir de un punto de inflexión, con una curvatura convexa, siendo fina, intensa, nítida.

Dos bandas de movilidad 55, de las cuales encontramos una en ambos sistemas y las dos en el sistema A S E/anti B S E, siendo concéntricas cuando no aparecían ambas. Curvas finas, nítidas, intensas y simétricas.

Una banda de movilidad 59, que nos aparecía solamente en el sistema A S E/ anti B S E, esporádicamente, con una frecuencia de un 30%. Era una banda fina, poco definida, simétrica.

Una banda de movilidad 66, que nos aparecía en los dos sistemas, aunque con distintas características, ya que en el sistema A S E/anti B S E tendía a aplanarse, mientras que en el sistema inverso era peque

ña, bien definida, simétrica, pero con una gran intensidad ambas.

Una banda de precipitación de movilidad 75, que nos aparecía en ambos sistemas, simétricas en ambos casos, con una intensidad similar, finas, intensas, nítidas, pero de una curvatura más amplia en el sistema A S E/anti B S E.

Una banda de precipitación de movilidad 82, que solamente encontramos en el sistema B S E/anti A S E, simétrica, intensa, fina.

Una banda de precipitación de movilidad 85, de similares características a la anterior, incluso en su presentación.

Una banda de movilidad 100 común a ambos sistemas, que, en el caso del A S E/anti B S E, parecía con tinuación de la banda de movilidad 55 más próxima al pocillo, siendo, en este caso, más amplia, algo aplanada, pero siempre intensa y nítida.

Una banda de precipitación de movilidad 103, que sólo encontramos en el sistema B S E/anti A S E. Siendo una banda con tendencia a una ligera asimetría. Intensa, fina, nítida y constante en este sistema.

Una banda de precipitación de movilidad 111, que encontramos solamente en el sistema A S E/anti B S E, pequeña, simétrica, fina nítida e intensa.

Una banda de precipitación de movilidad 129, que también encontramos en el sistema A S E/anti B S E simétrica, intensa, fina, nítida.

En total encontramos 17 bandas de precipitación en los dos sistemas, de las que, solamente, encontramos de idéntica movilidad cuatro de ellas.

En el sistema A S E/anti B S E, vimos que las características de las bandas que encontramos, eran algo diferentes del otro sistema, tendiendo a presentar una curvatura más amplia, más aplanada y algo menos intensa.

Consideramos que el total de componentes antígenicos relacionados entre ambas cepas bacterianas, con una similitud tan grande que reaccionaban específicamente entre sí eran estas 17, y que en unos casos se revelaban por un enfrentamiento y en otros casos aparecían en el inverso.

III.5.3.2. Componentes comunes reprimidos del B. sphaericus y A. simplex.

Para el estudio de estos elementos hemos partido de los enfrentamientos siguientes: En primer lugar el del antígeno A. simplex sin esteroides, con componentes no modificados y reprimidos de la cepa original, frente al inmunosuero anti B. sphaericus sin esteroides, de la misma composición antigénica, no modificados y reprimidos, absorbido con el antígeno B. sphaericus con esteroides, que le quitará los componentes no modificados, que les son comunes, con lo que este enfrentamiento nos dará los componentes reprimidos por el sustrato esteroide. También empleamos el enfrentamiento inverso, o sea, antígeno del B. sphaericus sin esteroides, frente al inmunosuero anti A. simplex sin esteroides, absorbido con el antígeno del A. simplex con esteroides. Es decir, según nuestra forma de representación esquemáticamente:

A S E/ anti B S E (B C E)

B S E/ anti A S E (A C E)

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, expresados como hemos venido haciendo por su movilidad relativa a la albúmina.

Una banda de precipitación de movilidad -16,

simétrica, nítida, fina, intensa, constante en todos los ensayos efectuados.

Una banda de precipitación de movilidad 03, fuerte, ancha, intensa, nítida, simétrica, constante en todos los ensayos efectuados.

Una banda de precipitación de movilidad 0, poco definidad, con tendencia a aplanarse, inconstante en su presentación, con una frecuencia de un 50%.

Una banda de precipitación de movilidad 32, poco definida, algo difusa, ligeramente convexa, aunque constante en su presentación.

Una banda de precipitación de movilidad 35, de características similares a la anterior.

Una banda de precipitación de movilidad 61, muy intensa, simétrica, nítida, fina, de presentación constante.

Una banda de precipitación de movilidad 64, de características similares a la anterior.

Una banda de precipitación de movilidad 87, pequeña, pero muy intensa, simétrica, nítida, de presencia constante en todos los ensayos.

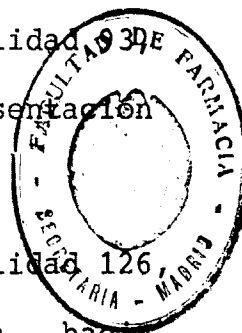
Una banda de precipitación de movilidad muy intensa, fina, nítida, simétrica, de presentación constante.

Una banda de precipitación de movilidad muy intensa, ancha, con una pendiente acusada hacia arriba, de presencia constante.

En total se obtuvieron diez bandas de precipitación como composición antigénica reprimida del sistema cruzado entre ambas cepas bacterianas. Este resultado está recogido en la Tabla VI., columna 2.

III.5.3.3. Componentes antigénicos comunes e inducidos del B. sphaericus y el A. simplex.

Para el estudio de esta composición utilizamos los siguientes sistemas de enfrentamiento, en primer lugar el enfrentamiento del antígeno del A. simplex con esteroides, que lleva los determinantes inducidos, por el sustrato frente al inmunosuero anti B.sphaericus con esteroides, que lleva los componentes inducidos propios, absorbido con el antígeno del B. sphaericus sin esteroides, que eliminaría los componentes comunes, que serían , en este caso, los no modificados por el sustrato, y, por otro lado, el sistema formado



por el antígeno del B. spaericus con esteroides, frente al inmunosuero anti A. simplex con esteroides, absorbiendo, a su vez, con el antígeno del A. simplex sin esteroides, en que sucedería lo mismo de antes. De esta forma obtendremos los componentes inducidos por el sustrato esteroide y que sean comunes a ambas cepas bacterianas. Esquematisando los enfrentamientos tendremos:

A C E/anti B C E (B S E)

B C E/anti A C E (A S E)

Están recogidos en los esquemas de la Fig.III.

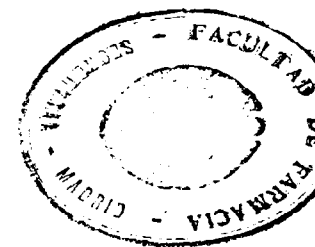
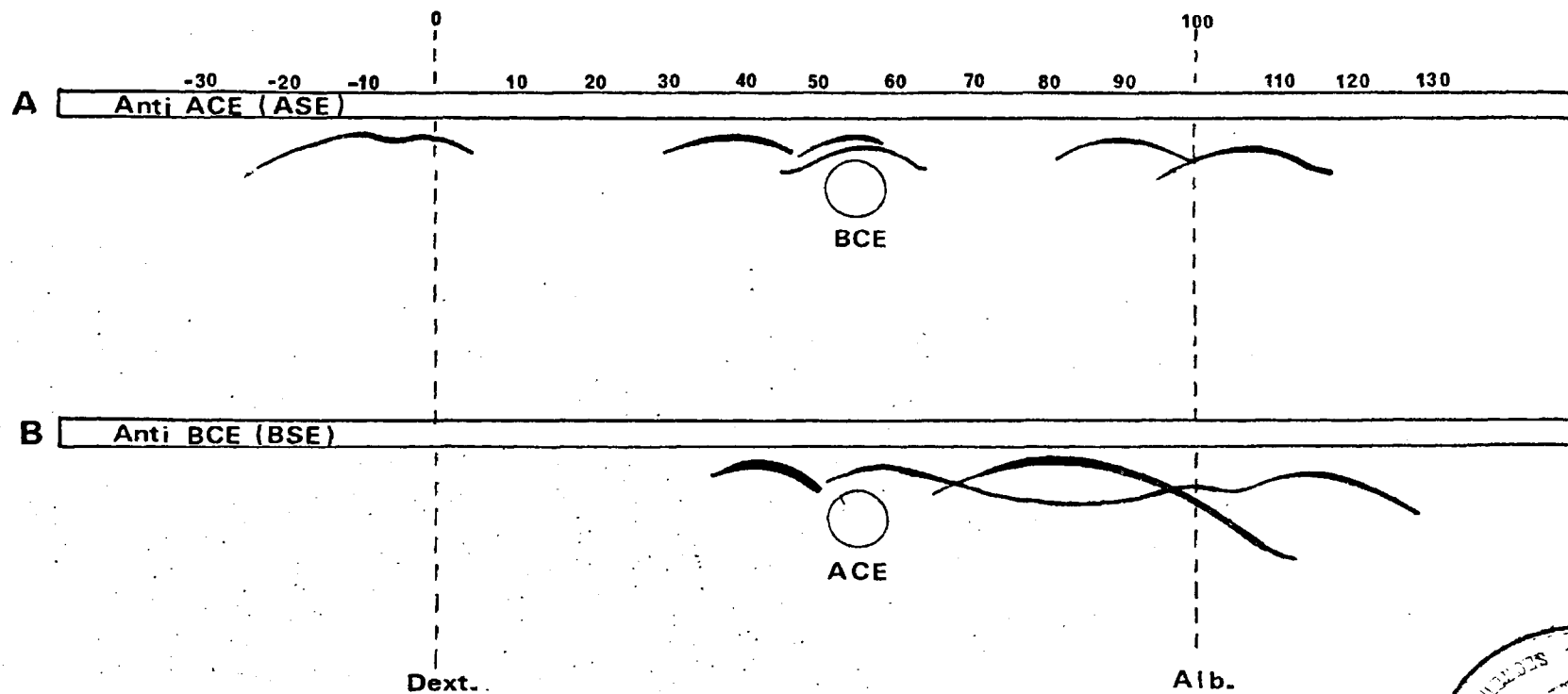
11.

Los resultados obtenidos, expresados como bandas de precipitación y según su movilidad relativa a la albúmina, fueron los siguientes:

Una banda de precipitación de movilidad -10, simétrica, fina, intensa, nítida, de aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de precipitación de movilidad -7, de características similares a la anterior. Una banda de precipitación de movilidad 46, pequeña, intensa, nítida, simétrica y de aparición constante en todos los ensayos efectuados.

Dos bandas de movilidad 55, 55a, y 55b, concén

Fig.III.11: Representa los enfrentamientos inmuno -
electroforéticos que nos darán los componentes in-
ducidos comunes, el antígeno B C E frente al immuno-
suero anti A C E absorbido con el antígeno A S E,
y el enfrentamiento del antígeno A C E frente al
inmunosuero anti B C E absorbido con el antígeno
B S E.



tricas, simétricas, finas e intensas. De aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de movilidad 59, de características similares a las dos anteriores. Una banda de movilidad 75, muy intensa, simétrica, ancha, nítida, de aparición constante en todos los ensayos efectuados. Una banda de movilidad 85, de características similares a la anterior. Una banda de precipitación de movilidad 100, similar a las dos anteriores en sus características. Una banda de movilidad 107, muy intensa, algo más ancha que las anteriores, simétrica y de aparición constante. Una banda de precipitación de movilidad 114, ligeramente asimétrica, con tendencia a la formación de una S muy alargada, intensa, fina, de presencia constante en todos los ensayos efectuados.

En total obtuvimos once bandas de precipitación como composición antigénica inducida común entre ambas cepas bacterianas. Estos resultados están expuestos en el esquema de la Tabla VI.

III.5.3.4. Composición antigénica común total del B. sphericus y A. simplex, deducida de los resultados anteriores.

Resumiendo los resultados obtenidos en la investigación de la comunidad antigénica entre las dos ce

Tabla VI.-Recoge los componentes antigénicos
comunes para el *Arthrobacter simplex* y el
Bacillus sphaericus.

Movilidad	Constitutivas	Reprimidas	Inducidas
	+		
-16	x	x	
-10			x
- 7			x
- 3	x	x	
0	x	x	
25	x		
32	x	x	
35	x	x	
46			x
55	x		x
55			x
59			x
61	x	x	
64	x	x	
66	x		
75			x
82	x		
85			x
87	x	x	
93	x	x	
100			x
103	x		
107			x
111	x		
114			x
126	x	x	
Nº	16	10	11

pas bacterianas estudiadas, tanto en su enfrentamiento directo, como los resultados obtenidos al introducir un elemento inductor y represor, como es el sustrato esteroide utilizado, nos encontramos con un total de 26 bandas de precipitación comunes a ambas cepas bacterianas.

Estos resultados los recogemos en la Tabla VI. Llama la atención la gran comunidad antigénica encontrada entre estas dos cepas, en que nos encontramos con un total de 16 bandas de precipitación comunes en el enfrentamiento directo, diez como componentes reprimidos por la presencia del sustrato y de once inducidas por él. Efectuamos unas comprobaciones posteriores mediante el empleo de inmonodifusión e inmunoelectroforesis que nos evidenciarán de una manera inequívoca, la existencia de componentes antigénicos comunes, que describimos en el apartado siguiente.

III.5.3.5. Comprobaciones complementarias de la identidad antigénica entre ambas especies.

Hemos visto en los apartados anteriores la existencia de un gran número de componentes comunes entre ambas especies bacterianas, tanto en los componentes constitutivos, como en los reprimidos e inducidos.

Hemos dado por idénticos aquellos que presentan la misma movilidad electroforética, siguiendo los criterios admitidos en Inmunología, en que idéntica movilidad inmunoelectroforética significa identidad de los compo - nentes que la posean. No obstante, como comprobaciones de la veracidad de este aserto acudimos a la realiza - ción de unas pruebas complementarias de esta identidad mediante la realización de unos enfrentamientos cruza - dos utilizando la inmunodifusión según Ouchterlony, técnica aún más específica que la inmunolectroforesis, en frentamientos que describimos a continuación.

Para este cometido utilizamos la immuno difu sión según Ouchterlony, con una disposición especial de los pocillos, siguiendo dos patrones, recogidos en la figura II.4. Uno de ellos consiste en la prepara - ción de tres filas de pocillos, con la del centro des - plazada con respecto a las otras dos. La segunda dispo - sición la denominaremos de 7 pocillos, pues este es el número total de los empleados.

1.- Inmunodifusión con tres filas de poci - llos.

En este dispositivo colocamos tres filas de pocillos, con el central algo desplazado, en forma de

Fig.III.12.-Esquema de los Ouchterlony de tres pocillos,utilizando como antígeno el A C E.

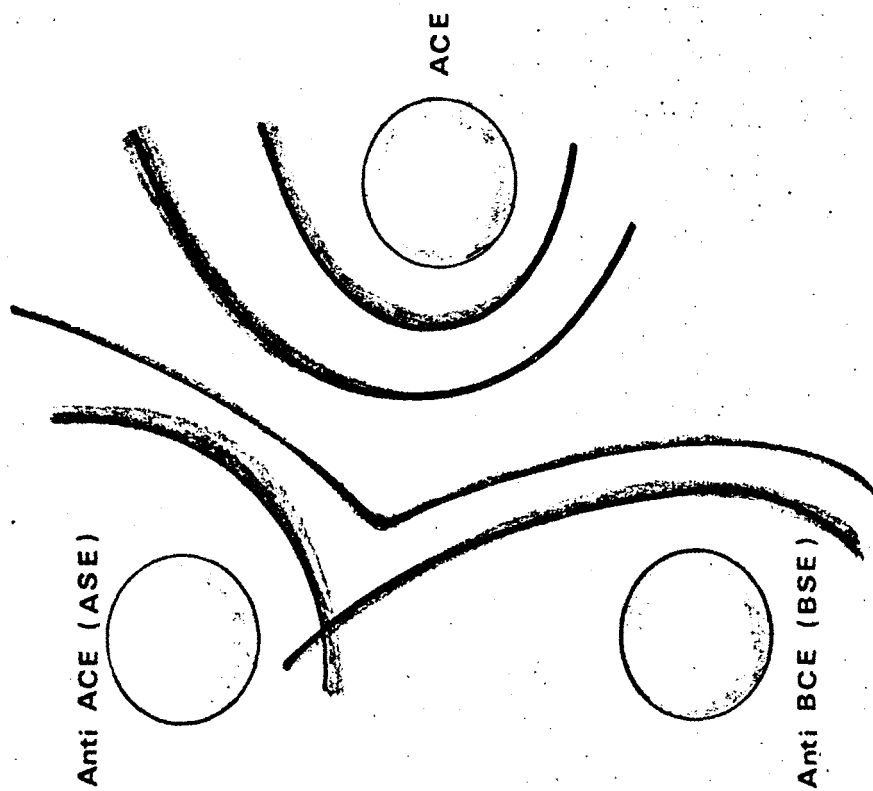
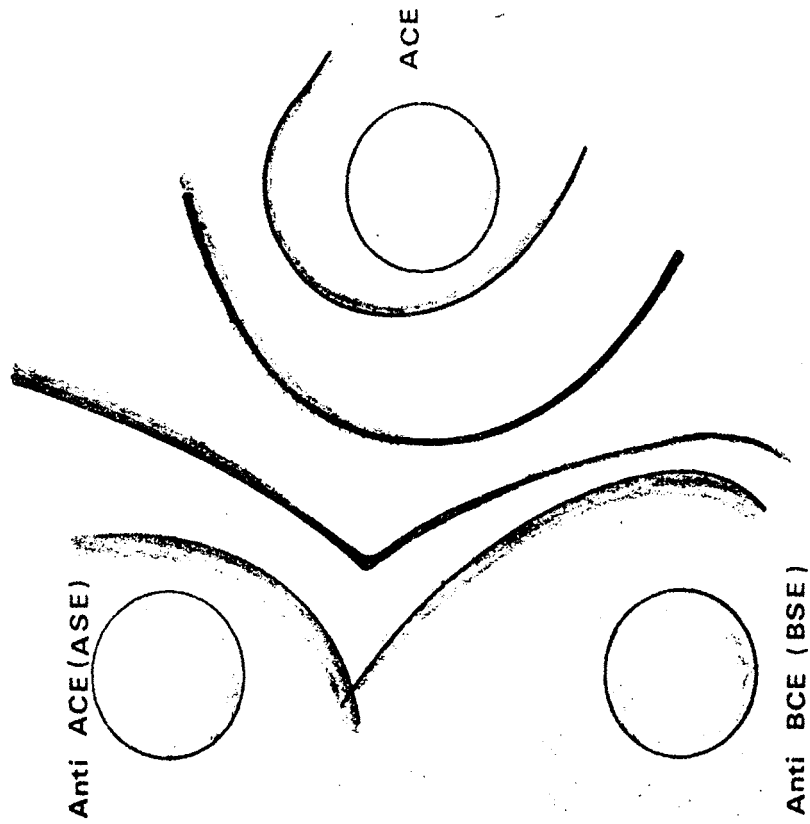


Fig.III.13: Esquema de los Ouchterlony de tres pocillos,utilizando como antígeno el B C E.

Anti ACE (ASE)

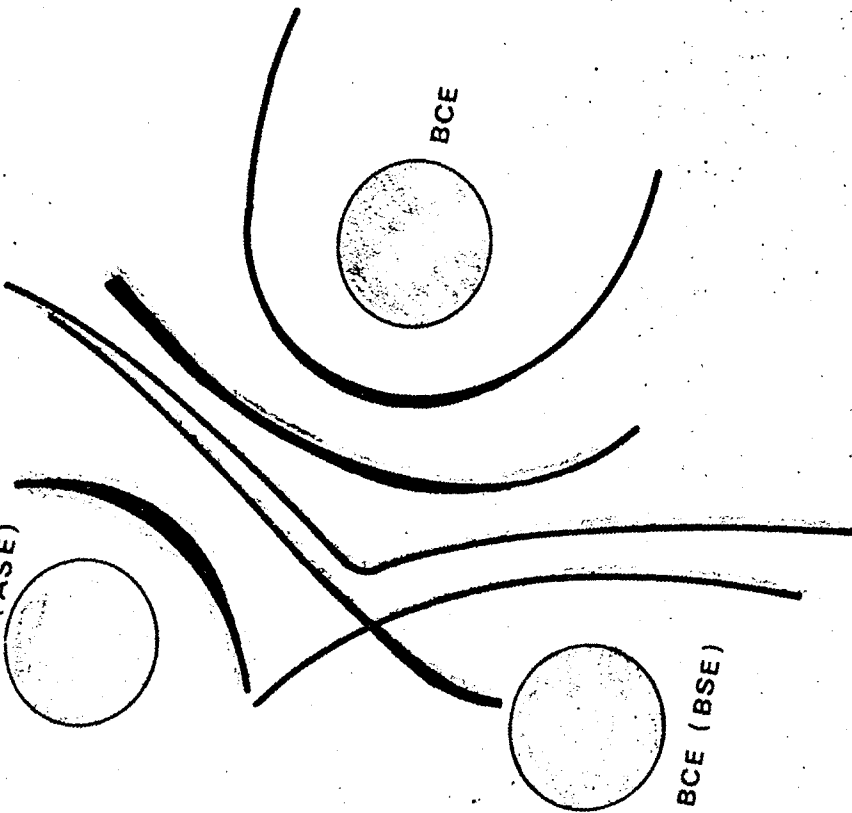
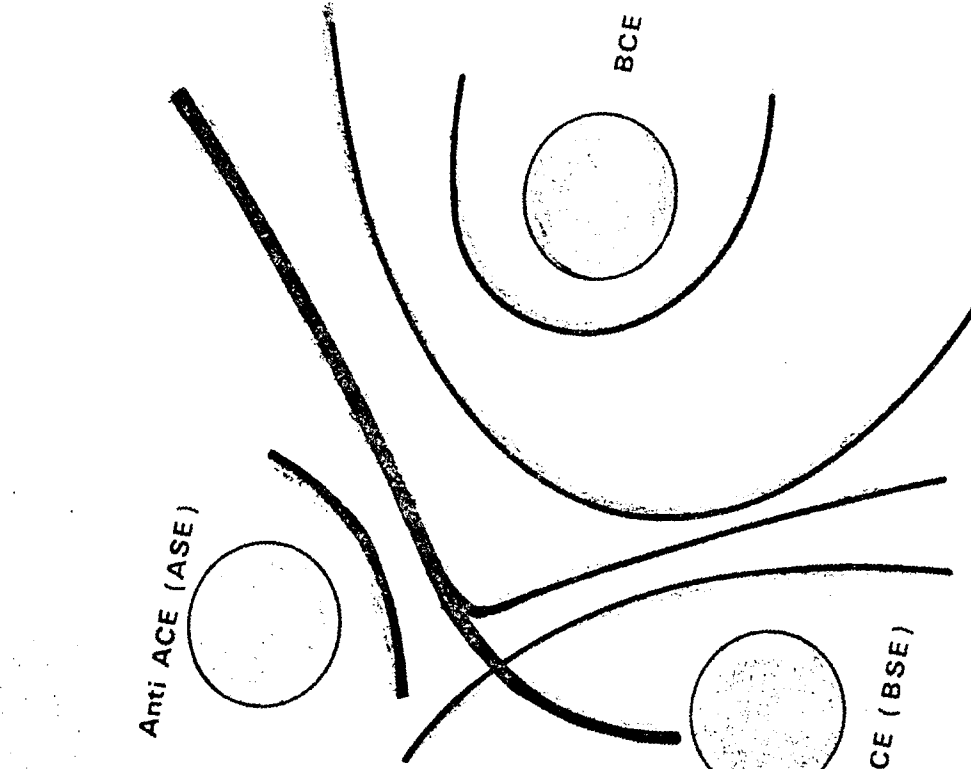
BCE

Anti BCE (BSE)

Anti ACE (ASE)

BCE

Anti BCE (BSE)



flecha. En la fila superior colocamos, en una serie de portaobjetos, el inmunosuero anti A. simplex con este-roides, absorbido con el antígeno del A S E. En la fila inferior, el inmunosuero anti B C E, absorbido con el antígeno B S E. En la serie central, la desplazada, colocamos, en una de las series, el antígeno correspon-diente al A C E.

Los resultados que obtuvimos, esquematizados en la Fig. III. 12 y III.13., fueron los siguientes: En la primera serie, en la que utilizamos como antígeno el A C E, dos bandas de precipitación con reacción de identidad, otra con reacción de identidad parcial y otra diferente.

En la serie correspondiente al antígeno B C-E, encontramos dos bandas con reacción de identidad , otra banda con identidad parcial y otras dos diferen-tes.

Esto nos demuestra claramente que existe co-munidad antigénica entre ambas especies bacterianas, con una identidad parcial en sus componentes antigéni-cos.

2.- Inmunodifusión de 7 pocillos.

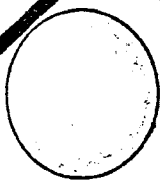
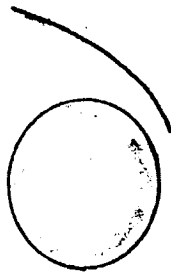
Para la realización de esta comprobación, pro

Fig.III.14.-Esquema de los Ouchterlony de siete pocillos.

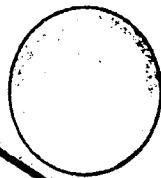
Anti BSE (BCE)

Anti ASE (ACE)

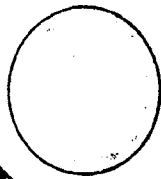
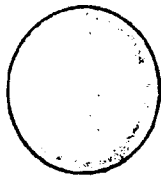
Anti ASE (ACE)



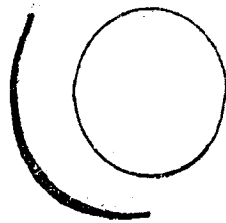
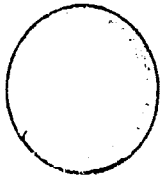
BCE



ASE



BSE



ACE

cedimos a la preparación de unos portaobjetos, según describimos en el apartado correspondiente, II.4., para la realización de la inmunodifusión, con una disposición de los pocillos en dos filas, con un total de siete, tal como representa el esquema de la Fig. II.4.

En la fila superior de los pocillos, colocamos los inmunosueros absorbidos. Anti B S E, absorbido con B C E; anti A S E, absorbido con A C E; anti A S E absorbido con A C E.

En la fila inferior colocamos, en el pocillo 1, el antígeno B C E, en el 2, el antígeno A S E, en el 3, el antígeno B S E y en el 4, el antígeno A C E.

Los resultados obtenidos, esquematizados en la Fig. III. 14, fueron espectaculares, ya que obtuvimos una gran banda de precipitación, continua, entre los tres primeros pocillos de la parte inferior, de los antígenos, frente a los tres superiores, de los inmunosueros. En el cuarto pocillo inferior, que nos servía de control de absorción, no obteníamos esta banda de precipitación, solamente una pequeña banda de precipitación, debida a algún componente mal absorbido, pero que no presentaba identidad con la banda anterior.

Este resultado nos demuestra una gran comuni

dad antigénica entre los sistemas heterólogos en cuanto a las bacterias y en cuanto al sustrato.

Aparte de esta gran banda común, existen algunas otras en los sistemas heterólogos, que refuerzan nuestras observaciones acerca de la comunidad antigénica entre estos sistemas heterólogos.

III.6. Estudio de la transformación de los esteroides.

Dentro de los límites que nos hemos trazado en la realización de este trabajo, que el objetivo principal es el estudio de la dinámica de los componentes enzimáticos implicados en este proceso, mediante el revelado inmunológico, una de las comprobaciones que hemos realizado es ver la realidad de esta transformación mediante la la puesta en evidencia de que a partir de un sustrato, Sustancia S de Reichstein, en nuestro caso concreto, hemos obtenido otros productos diferentes mediante la acción de los microorganismos utilizados.

Para ello hemos buscado, en primer lugar, en qué fracción podíamos encontrar los productos transformados, ya que, en algunos casos, éstos se pueden encontrar en el medio de cultivo y, en otros, en el interior de las células microbianas, Gale y col., 1962.

Por ello, como orientación, procedimos a la separación, mediante centrifugación y lavado del sedimento bacteriano, reuniendo, por un lado, el sobrenadante de las centrifugaciones del medio de cultivo utilizado para la transformación, y, por otro lado, el sedimento bacteriano, que sometimos a ultrasonación,

para obtener los líquidos intracitoplasmáticos. Con estas dos primeras fracciones, procedimos a la realización de unas cromatografías en capa fina, sobre Silica gel, en que colocamos las muestras alternadamente, junto con un control repetido, de la sustancia de partida que nos permitiese la comparación de su movilidad.

Los resultados obtenidos nos demostraron que solamente encontrábamos sustancias de tipo esteroide en las muestras correspondientes a los sobrenadantes de los cultivos, por lo que, en nuestro caso concreto, la transformación era extracelular y, solamente allí, encontraríamos las sustancias objeto de nuestro estudio, por lo que, en lo sucesivo sólo trabajamos con esta fracción.

Esta comprobación la realizamos con las bacterias objeto de nuestro estudio.

Conocido este extremo, convenía comprobar si después de la extracción con un solvente orgánico, los esteroides eran recogidos totalmente por este solvente o quedaba algún resto de ellos en la fracción acuosa.

La realización de la cromatografía en capa fina la detallamos en el apartado II.6.3.

Esta precaución de comprobar la presencia de esteroides en cada una de las fracciones, la realizamos con todas las bacterias estudiadas, exponiéndolo más adelante en el capítulo correspondiente.

La sistemática seguida en el estudio de los componentes esteroides la expusimos en el apartado II. 6., en que detallamos los pasos dados en este sentido.

Primero extracción, análisis de las dos fracciones por cromatografía en capa fina, cromatografía en columna para la separación de los distintos componentes presentes, y, por último, las técnicas de identificación de estas sustancias.

III.6.1. Estudio del *Arthrobacter simplex*:

A un cultivo de *A. simplex* de cuatro días de incubación, dos en el primer medio de cultivo, Ap. II. 1.2., y otros dos en el segundo medio, añadimos al sustrato esteroide en cantidades de 50 mg. por cada 100 ml. de medio de cultivo, manteniendo la incubación por 96 horas, al cabo de este tiempo extrajimos con acetato de etilo, repitiendo por tres veces dicha extracción con cada porción del medio, separando las dos fracciones, la acuosa y la del solvente orgánico, procediendo a la realización de una capa fina con muestras de ambas, para elucidar en cuál de ellas en contrábamos manchas relativas a la presencia de esteroides.;

En dichas cromatografías observamos la total ausencia de manchas de este tipo en la fracción acuosa, por lo que la desechamos, procediendo al estudio de la fracción del acetato de etilo, en la que sí visualizamos manchas correspondientes a esteroides.

El primer paso fue la concentración mediante rotavapor, que llevamos a sequedad y redisolvimos en un disolvente apropiado, cloroformo en este caso, para la

eliminación de compuestos inorgánicos que pudiesen in
terferir en el estudio posterior.

Una capa fina realizada nos dió como resul-
tado, la aparición de varias manchas de tipo esteroi-
de, correspondiendo una de ellas al sustrato y otras,
más lenta, a una sustancia de transformación.

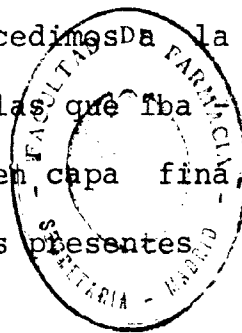
Decimos que una de las manchas correspondía
al sustrato, ya que siempre colocábamos, como control,
varios puntos de esta sustancia de partida, la Sustan
cia S de Reichstein.

Una vez comprobada la existencia de una
transformación del sustrato, procedimos al montaje de
una columna cromatográfica, del tipo seco, para inten
tar su separación e identificación.

La descripción de este tipo de columnas es
tá expuesta en el Apartado II.6.5.

Colocamos en ella la muestra procedente de
la extracción, disuelta a partir del extracto seco an
terior en una mínima cantidad de acetato de etilo, y
procedimos a su procesado, mediante la elución con la
mezcla Benceno-Acetato de Etilo, en la proporción

En marcha ya esta columna, procedimos a la recolección de fracciones de 50 ml., en las que vamos comprobando, mediante cromatografía en capa fina, la aparición de las sustancias esteroideas presentes en la muestra.



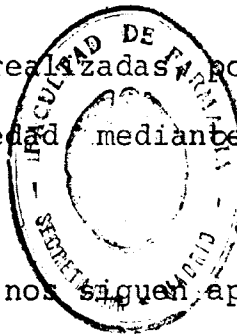
Los eluyentes empleados en la realización de estas capas finas fueron siempre Benceno-Acetato de Etilo, pero variando su polaridad de acuerdo con la velocidad de emigración del frente. Así empleamos, para las primeras fracciones, hasta la 20, la proporción 60/40, y 1/1, paralelamente, ya que realizamos estas comprobaciones por duplicado, con uno o varios puntos de la sustancia de partida como control. A partir de la fracción 20, empleamos la polaridad del eluyente, pasando a la proporción de Benceno-Acetato de Etilo al 40/60.

Las diez primeras fracciones no nos dieron ninguna mancha significativa de la presencia de esteroideos.

A partir de la fracción 11, nos comienza a aparecer la sustancia de partida.

Las fracciones 11, hasta la 16, nos aparece

una mancha única en las capas finas realizadas, por lo que las reunimos, llevándolas a sequedad mediante rotavapor.



En las fracciones 17 a 20, nos siguen apareciendo restos de la sustancia de partida, por lo que las reunimos con las fracciones anteriores. Concentramos y llevamos a sequedad.

El peso seco del residuo fue de 384 mg.

Cristalizamos en metanol, procediendo a su estudio químico, mediante la determinación de su punto de fusión, que fue de 213.218° C.

La absorción máxima en ultravioleta fue de 240 n.m.

Determinamos también sus espectros infrarrojos y resonancia magnética nuclear, que adjuntamos. Fig. III.16, III.17.

En este momento cambiamos la polaridad del eluyente, pasando a Acetato de Etilo sólo.

En las fracciones 21 a 24 no encontramos ninguna mancha en las capas finas realizadas, por lo que las desechamos.

En las fracciones 25 a 28, nos encontramos

de nuevo con una mancha única, por lo que las reunimos con ellas, concentramos y llevamos a sequedad. El peso del residuo fue de 32,4 mg. Este residuo era muy soluble en Acetato de Etilo. Intentamos cristalizar en metanol, no consiguiéndolo.

A partir de esta muestra procedimos a su estudio espectroscópico, adjuntando los espectros de infrarrojo, y N M R. Fig. III.18, y III.19. La absorción en ultravioleta fue de 244 nm.

En las fracciones posteriores nos encontramos ninguna mancha, por lo que dimos por terminada la cromatografía, procediendo al lavado de la columna con metanol.

III.6.2. Estudio del *Arthrobacter simplex* con Naranja de acridina.

Como expresamos en el apartado II.1.3., también procedimos al estudio de la transformación microbiana de esteroides con microorganismos en presencia de Naranja de Acridina, como factor inhibidor de algunas actividades vitales de los microorganismos, por si esta sustancia causaba alguna alteración de su comportamiento en la actividad transformante.

En este sentido procedimos a la realización de este supuesto, siguiendo, exactamente, los mismos pasos que realizamos con la bacteria normalmente, mismos tiempos, etc., exceptuando la adición de naranja de acridina al medio de cultivo, por lo que no repetimos estos datos en virtud de una mayor agilidad en la exposición. Igualmente procedimos en la extracción de productos, tal como describimos en el apartado III. 6.1., siguiendo la misma pauta.

Procedimos, posteriormente, al mentaje de una columna seca, Ap. II.6.5. para la separación de estos productos.

Empleamos como eluyentes Benceno-Acetato de Etilo, en la concentración 70/30.

Las ocho primeras fracciones no nos dieron ninguna mancha en las capas finas de control realizadas, por lo que las desechamos.

Las fracciones 9 a 14 nos dieron manchas significativas de esteroides, correspondientes a la sustancia de partida, en las capas finas correspondientes. Las reunimos y llevamos a sequedad.

Las tres siguientes fracciones nos sigue -

ron dando trazas de la sustancia de partida, por lo que las reunimos con las anteriores, llevándolas a sequedad juntas. El peso del residuo seco fue de 418 mg.

Esta sustancia era muy soluble en benceno. Determinamos su punto de fusión, previa cristalización con metanol, obteniendo un punto de fusión de 214-219° C.

También realizamos su estudio espectroscópico, infrarrojo, ultravioleta y N M R, que adjuntamos.

En este momento cambiamos la polaridad del eluyente a Acetato de Etilo solamente.

Las fracciones 18 a 22 no nos dieron ninguna mancha correspondiente a esteroides.

Las fracciones 23 a 26, nos volvieron a dar manchas de esteroides, una mancha única, por lo que las reunimos y llevamos a sequedad.

Las dos siguientes fracciones nos dieron restos de esta misma sustancia anterior, por lo que las reunimos con ellas, llevándolas a sequedad. El peso del residuo seco fue de 19,8 mg.

Realizamos su estudio espectrofráfico, ya que no pudimos cristalizarlo y obtener su punto de fusión.

Los espectros correspondientes los adjuntamos.

Las fracciones posteriores no nos dieron ninguna mancha, por lo que las desechamos y procedimos al lavado de la columna con metanol.

III.6.3. Estudio del *Bacillus sphaericus*.

A un cultivo de *B. sphaericus* de cuatro días de antigüedad, según describimos en el Apartado II.1.2, añadimos al sustrato esteroide, Sustancia S de Reichstein, en este caso concreto, en cantidades de 50 mg., por cada 100 ml. del medio de cultivo, manteniendo la incubación durante otras 96 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, procedimos según la pauta expuesta en el apartado III.6.1.

Comprobada por la cromatografía en capa fina la existencia de una transformación, con un mínimo de dos sustancias transformadas, procedimos al montaje de una columna, del tipo denominado seco, para intentar la separación de los distintos componentes existentes en el producto de reacción.

La descripción de esta columna la recogemos en el apartado II.6.5. Solamente hemos de puntualizar aquí que utilizamos como eluyente Benceno-Acetato de

Etilo en la proporción 70/30.

Una vez llevada a sequedad la fracción orgánica de la extracción en un rotavapor, disolvimos en una mínima cantidad de Acetato de Etilo, con el fin de colocarla en la columna cromatográfica.

En marcha ya esta columna, procedimos a la recogida de fracciones de 50 ml. cada una, que íbamos controlando mediante la realización de cromatografía en capa fina, colocando siempre como control, un punto al menos de la sustancia de partida.

Estas cromatografías las realizamos utilizando como eluyente, Benceno-Acetato de Etilo en las proporciones 60/40 y 1/1 simultáneamente. Al llegar a la fracción 20 cambiamos la polaridad del eluyente, pasando a Acetato de Etilo solamente.

En las primeras once fracciones de esta columna no encontramos sino impurezas.

En las fracciones 12 a 17, obtuvimos manchas correspondientes a la sustancia de partida, por lo que las reunimos u concentramos a sequedad.

Las tres siguientes fracciones, 18, 19, 20, nos dieron restos de la sustancia de partida, por lo

que las reunimos con las anteriores, llevándolas a sequedad juntas. El peso seco fue de 394 mg.

Procedimos a la cristalización en metanol de esta sustancia, determinando el punto de fusión, que nos dió 219-221² C.

También realizamos su estudio espectroscópico, determinando los espectros infrarrojo, ultravioleta y N M R., que adjuntamos.

En este momento cambiamos la polaridad del eluyente a acetato de etilo sólo.

Las tres fracciones siguientes no nos dieron manchas de esteroides en las capas finas realizadas.

Las fracciones 24 a 28, nos volvieron a dar manchas de compuestos esteroides. Una mancha única, por lo que las reunimos y concentramos.

Las fracciones 25 a 29, nos dieron restos de esta misma sustancia, por lo que las reunimos con las fracciones anteriores y llevamos juntas a sequedad. El peso del residuo seco fue 23,8 mg.

No conseguimos su cristalización, pero sí realizamos su estudio espectrofráfico. Los gráficos correspondientes a infrarrojos, ultravioleta y N M R, los

adjuntamos.

Las fracciones posteriores no nos dieron ninguna mancha de tipo esteroide, por lo que las desecharmos y procedimos al lavado de la columna con metanol.

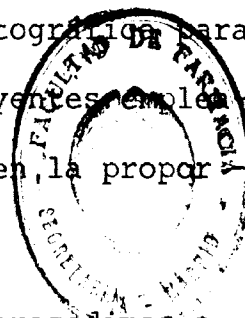
III.6.4. Estudio del *Bacillus sphaericus* con Naranja de Acridina.

En el apartado II.1.3., describimos el cultivo de este microorganismo con la adición de Naranja de Acridina, como inhibidor de algunas manifestaciones vitales de las bacterias en general, por lo que incluimos este estudio, que realizamos en la posibilidad que afectase, también, la transformación microbiana de esteroides.

En este sentido procedimos a la realización de esta experiencia siguiendo, exactamente, los demás pasos realizados con la bacteria sin el agente inhibidor, medio de cultivo, tiempo de cultivo, adición del sustrato en las mismas proporciones y mantenimiento del tiempo de reacción exactamente igual, con la única excepción ya apuntada, y que describimos en el Apartado II.1.3., de la presencia de la Naranja de Acridina.

Una vez finalizado el tiempo de reacción pro

cedimos según la pauta expuesta en el apartado III.6.1. A continuación montamos la columna cromatográfica para la separación de los productos. Como eluyentes empleamos la mezcla Benceno-Acetato de Etilo, en la proporción 70/30.



Una vez en marcha la columna, procedimos a la recogida de fracciones de 50 ml., que íbamos comprobando continuamente mediante la cromatografía en capa fina, en las mismas condiciones ya descritas repetidamente, simultaneando, también, dos polaridades del eluyente, Benceno-Acetato de Etilo, al 60/40 y 1/1, hasta la fracción 20 en que cambiamos la polaridad al 40/60, con el fin de visualizar mejor las manchas más lentas.

Las diez primeras fracciones de la columna, no nos dieron ninguna mancha de tipo esteroide, por lo que las desechamos.

Las fracciones siguientes, 11 a 16, nos dieron una mancha única, de tipo esteroide, por lo que las reunimos y llevamos a sequedad.

Las manchas 17 a 18, nos dieron la misma mancha que las anteriores fracciones, idénticas a las del producto de partida, por lo que las reunimos y concen-

tramos llevándolas a sequedad. El peso seco fue de 398 mg.

Cristalizamos en metanol, para la determinación del punto de fusión, que nos dió 220° C.

Realizamos su estudio espectroscópico, determinando los espectros infrarrojo, ultravioleta y N M R cuyos gráficos adjuntamos.

En este momento cambiamos el eluyente a acetato de etilo sólo.

Las fracciones siguientes, 20, 21, 22, y 23, no nos dieron ninguna mancha, por lo que las reunimos y concentramos.

Las fracciones 27, 28, 29, y 30, nos dieron restos de esta misma sustancia, por lo que las reunimos con las anteriores y llevamos juntas a sequedad. El peso seco de este residuo fue de 32,7 mg. Realizamos su estudio espectroscópico, cuyos gráficos adjuntamos.

Las siguientes fracciones no nos dieron ninguna mancha del tipo buscado, por lo que dimos por finalizada la cromatografía y procedimos al lavado de la columna con metanol.

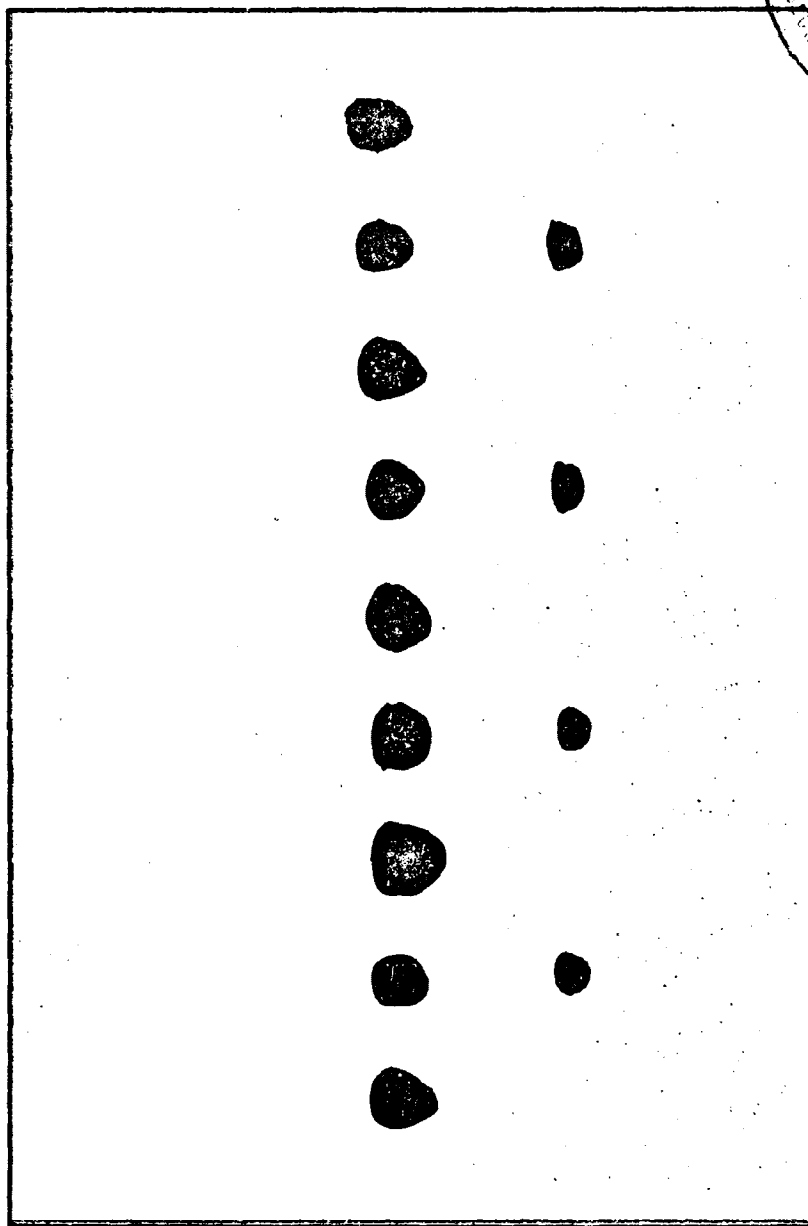
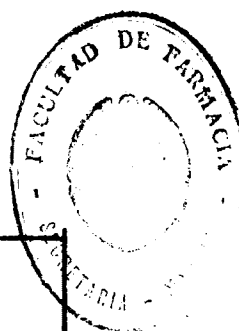
De la observación atenta de los gráficos an-

teriores vemos que hay una total identidad entre las fracciones obtenidas en primer lugar y en segundo en los cuatro casos anteriores, por lo que podemos decir, que se trata de las mismas sustancias obtenidas en los cuatro casos.

Por otro lado, como sabíamos qué sustancias podíamos obtener mediante estas bacterias, a partir del sustrato utilizado, procedimos a la realización de los espectros de las sustancias de transformación, a partir de muestras suministradas por una casa comercial. Los espectros obtenidos de la primera sustancia, que separamos, y los de la sustancia de partida, la Sustancia S de Reichstein, eran totalmente superponibles, por lo queda demostrado su total identidad.

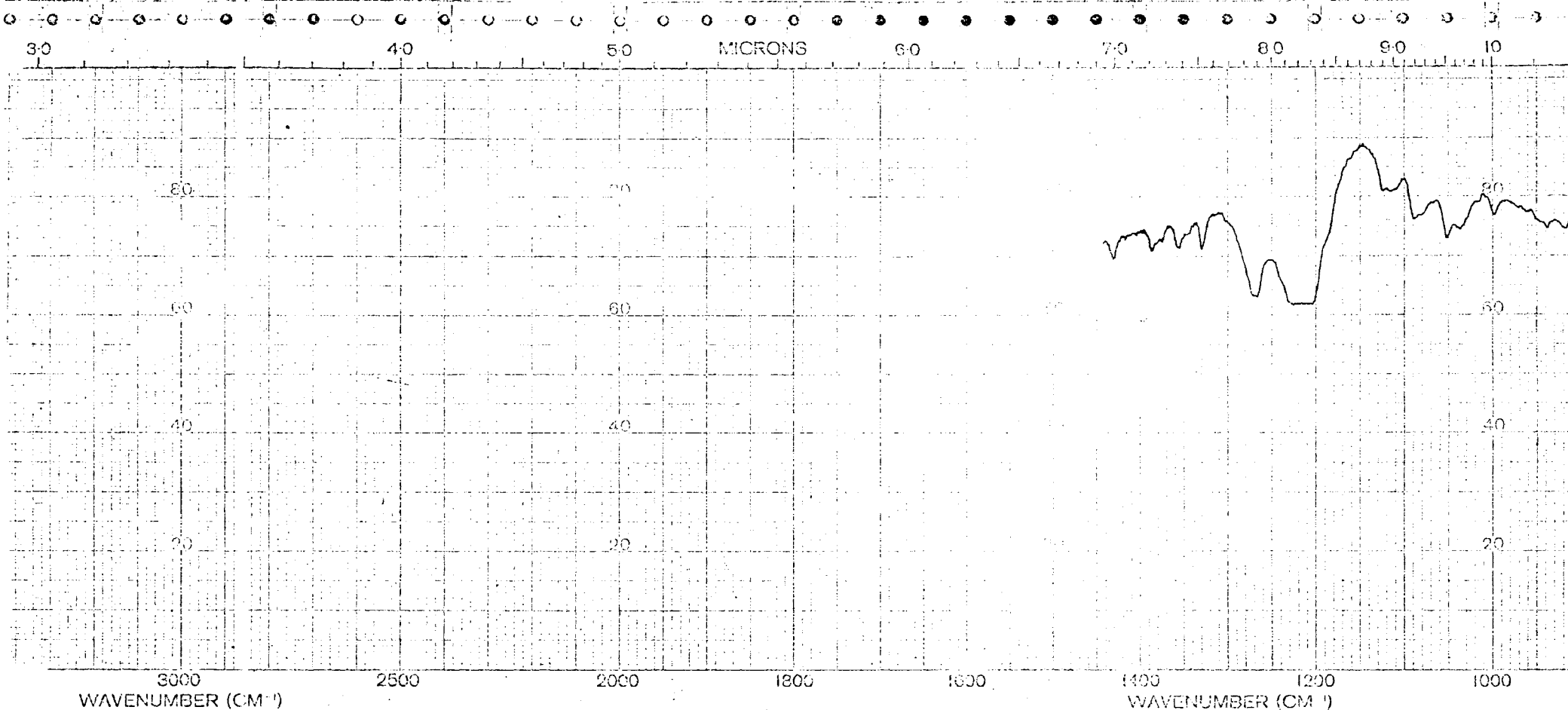
De manera similar procedimos con la segunda sustancia separada, la transformada por la acción bacteriana, el 1,3 pregnadien -3, 20 diona. Obtenida esta sustancia a partir de una muestra comercial y realizados sus espectros, eran totalmente superponibles a los obtenidos a partir de la segunda sustancia separada, por lo que podemos estar seguros de su identidad.

Fig.III.15.-Esquema de las cromatografías en capa fina realizadas para la evidenciación de la transformación del sustrato.En los puntos impares se colocó la sustancia de partida.En el punto 2 la muestra de A.simplex.En el punto 4 el correspondiente a A.simplex con naranja de acridina.En 6 la muestra de B.sphaericus.En 8 la muestra de B.sphaericus con naranja de acridina.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig.III.16.Espectro de infrarrojos correspondiente a la primera fracción aislada en la columna cromatográfica.



SOLVENT CH₃CH
CONCENTRATION ?
CELL PATH 0.1 mm
REFERENCE 1603 cm⁻¹

REMARKS

SCAN SPEED Fast
SLIT N

PA 472-5089

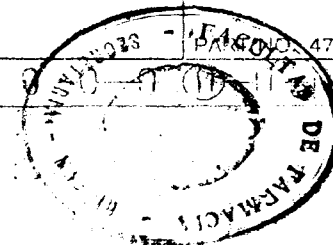
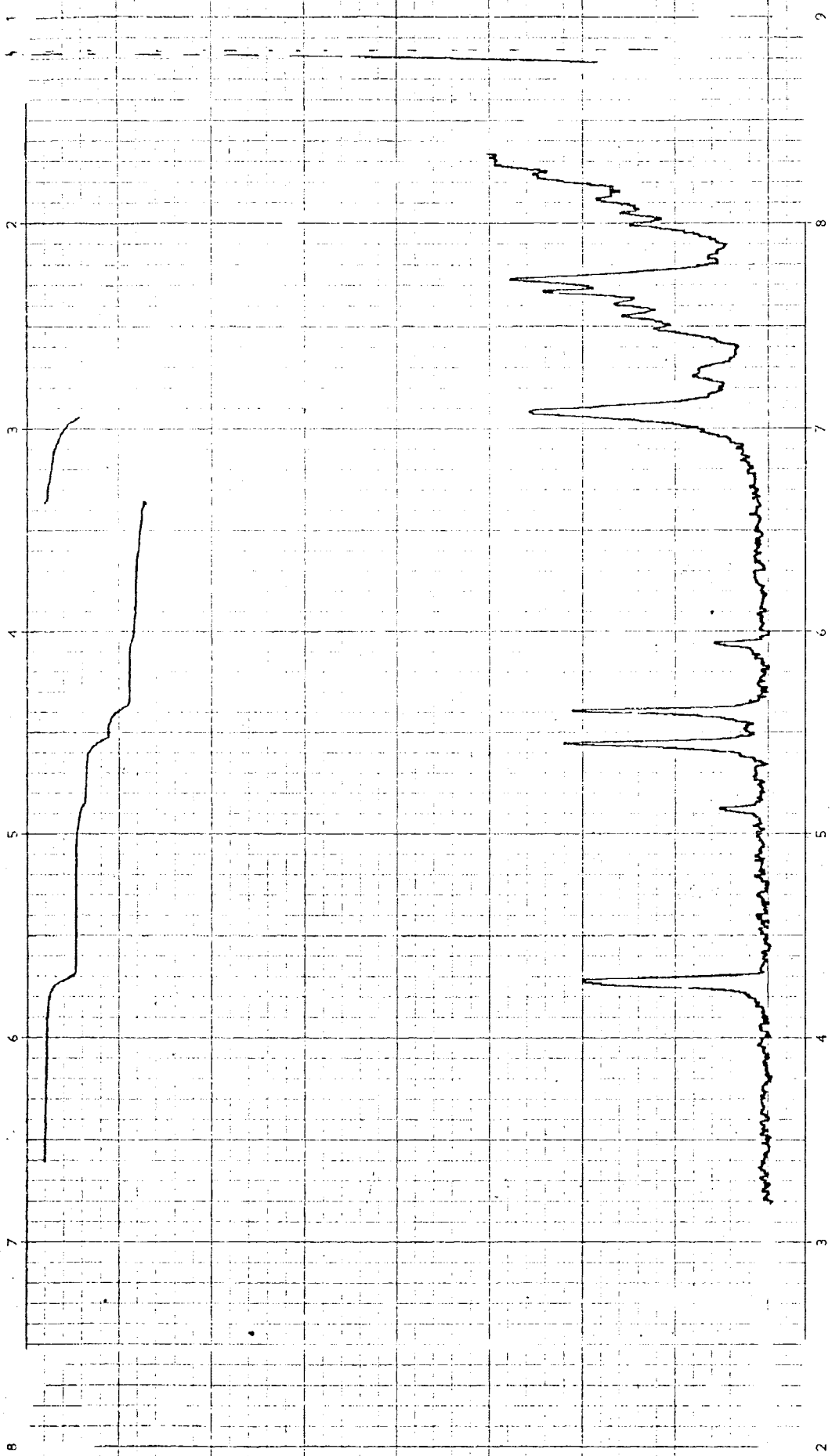


Fig.III.17.-Espectro de Resonancia Magnética
Nuclear correspondiente al primer producto
aislado en la columna cromatográfica.



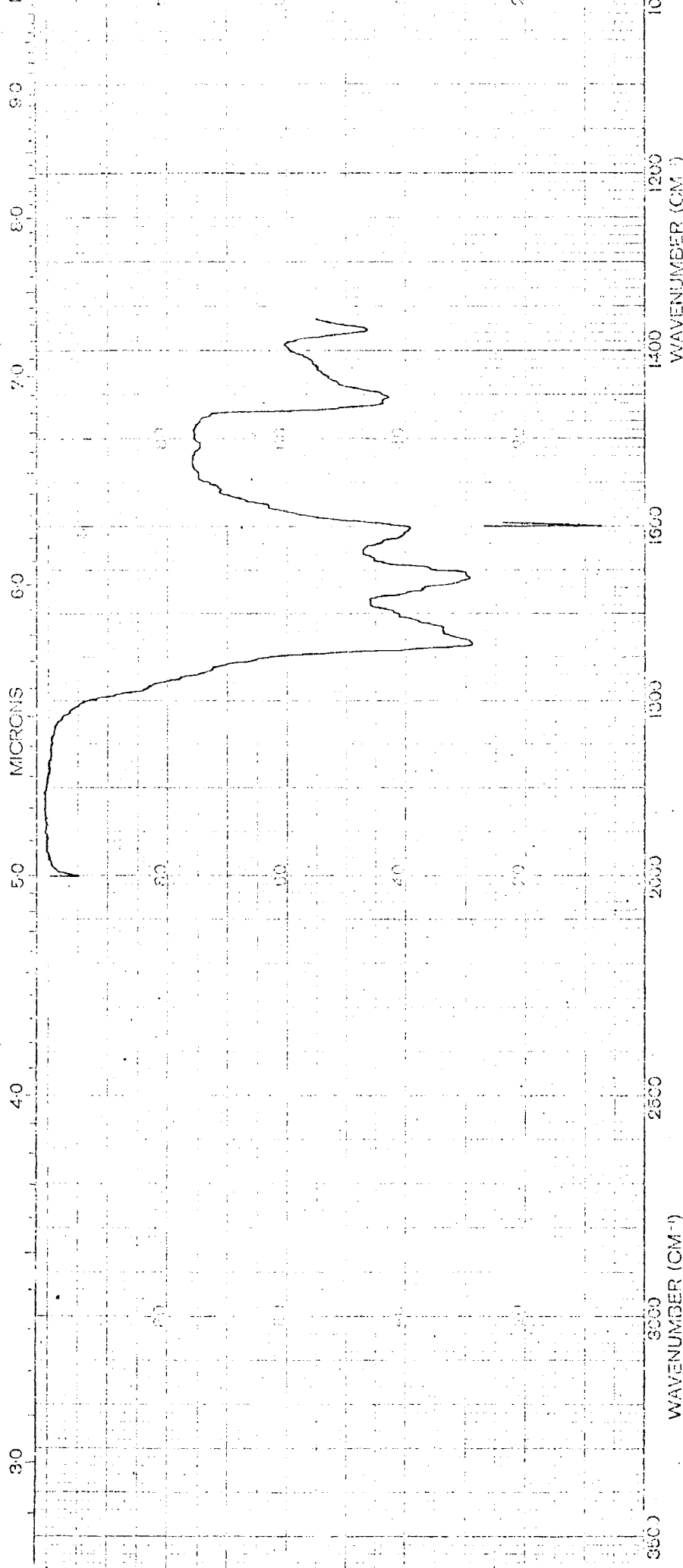


5/72

MADE IN GREAT BRITAIN

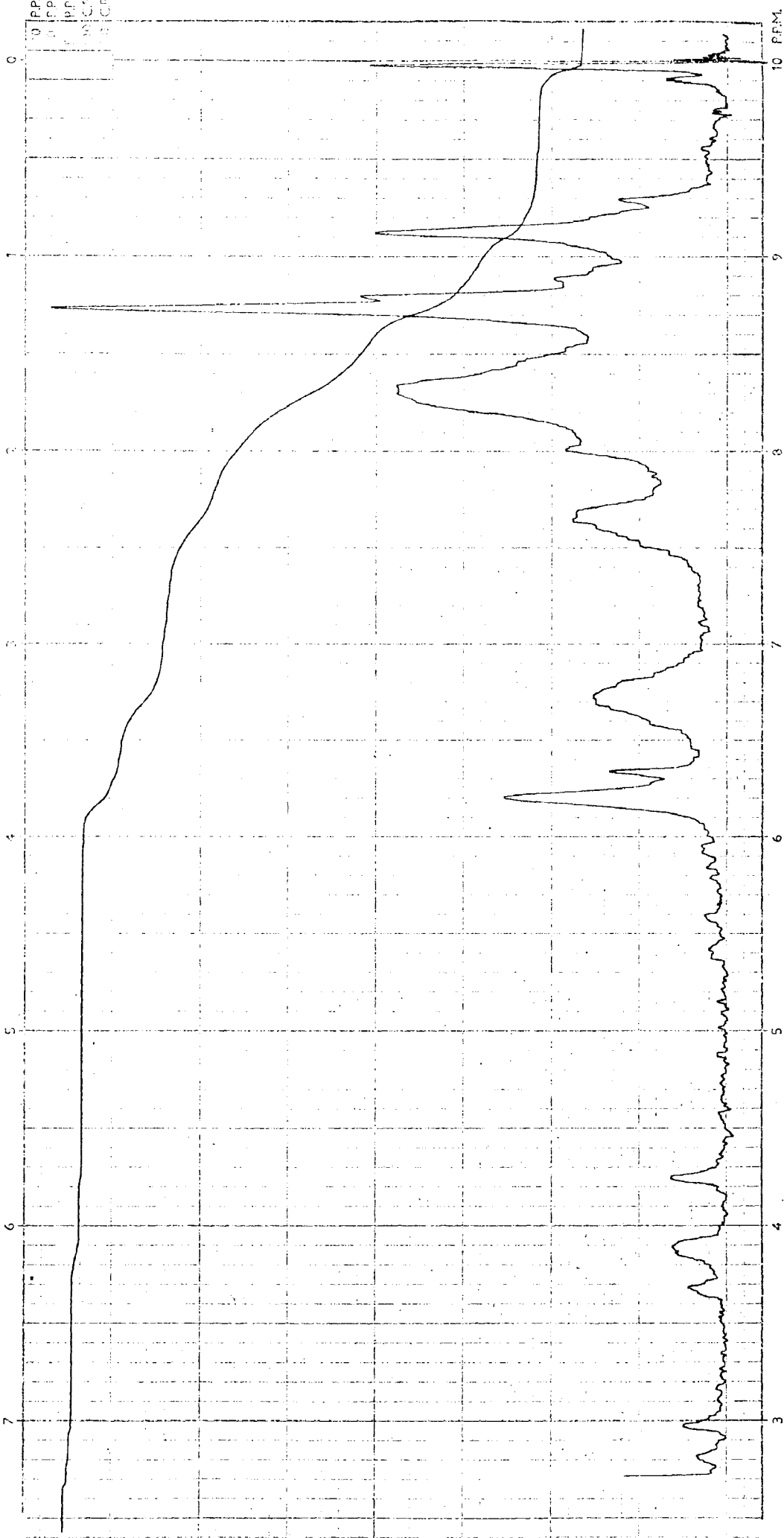
N^o 462-1075

Fig.III.18.-Espectro de infrarrojos correspondiente a la segunda sustancia aislada en la columna cromatográfica.



WAVENUMBER (CM⁻¹)		WAVENUMBER (CM⁻¹)		SCAN SPEED	Mod
3500		1200		SLIT	2J
3000		1000		REMARKS	
2500		800		Transf. microbian	
2000		600			
1500		500			
1000		400			
500		300			
10		5			
5		2.5			
2.5		1.5			
1.5		1.0			
1.0		0.5			
0.5		0.25			
0.25		0.125			
0.125		0.0625			
0.0625		0.03125			
0.03125		0.015625			
0.015625		0.0078125			
0.0078125		0.00390625			
0.00390625		0.001953125			
0.001953125		0.0009765625			
0.0009765625		0.00048828125			
0.00048828125		0.000244140625			
0.000244140625		0.0001220703125			
0.0001220703125		6.103515625E-05			
6.103515625E-05		3.0517578125E-05			
3.0517578125E-05		1.52587890625E-05			
1.52587890625E-05		7.62939453125E-06			
7.62939453125E-06		3.814697265625E-06			
3.814697265625E-06		1.9073486328125E-06			
1.9073486328125E-06		9.5367431640625E-07			
9.5367431640625E-07		4.76837158203125E-07			
4.76837158203125E-07		2.384185791015625E-07			
2.384185791015625E-07		1.1920928955078125E-07			
1.1920928955078125E-07		5.9604644775390625E-08			
5.9604644775390625E-08		2.9802322387695312E-08			
2.9802322387695312E-08		1.4901161193847656E-08			
1.4901161193847656E-08		7.450580596923828E-09			
7.450580596923828E-09		3.725290298461914E-09			
3.725290298461914E-09		1.862645149230957E-09			
1.862645149230957E-09		9.313225746154785E-10			
9.313225746154785E-10		4.656612873077392E-10			
4.656612873077392E-10		2.328306436538696E-10			
2.328306436538696E-10		1.164153218269348E-10			
1.164153218269348E-10		5.82076609134674E-11			
5.82076609134674E-11		2.91038304567337E-11			
2.91038304567337E-11		1.455191522836685E-11			
1.455191522836685E-11		7.275957614183425E-12			
7.275957614183425E-12		3.637978807091712E-12			
3.637978807091712E-12		1.818989403545856E-12			
1.818989403545856E-12		9.09494701772928E-13			
9.09494701772928E-13		4.54747350886464E-13			
4.54747350886464E-13		2.27373675443232E-13			
2.27373675443232E-13		1.13686837721616E-13			
1.13686837721616E-13		5.6843418860808E-14			
5.6843418860808E-14		2.8421709430404E-14			
2.8421709430404E-14		1.4210854715202E-14			
1.4210854715202E-14		7.105427357601E-15			
7.105427357601E-15		3.5527136788005E-15			
3.5527136788005E-15		1.77635683940025E-15			
1.77635683940025E-15		8.88178419700125E-16			
8.88178419700125E-16		4.440892098500625E-16			
4.440892098500625E-16		2.2204460492503125E-16			
2.2204460492503125E-16		1.1102230246251562E-16			
1.1102230246251562E-16		5.551115123125781E-17			
5.551115123125781E-17		2.7755575615628905E-17			
2.7755575615628905E-17		1.3877787807814452E-17			
1.3877787807814452E-17		6.938893903907226E-18			
6.938893903907226E-18		3.469446951953613E-18			
3.469446951953613E-18		1.7347234759768065E-18			
1.7347234759768065E-18		8.673617379884032E-19			
8.673617379884032E-19		4.336808689942016E-19			
4.336808689942016E-19		2.168404344971008E-19			
2.168404344971008E-19		1.084202172485504E-19			
1.084202172485504E-19		5.42101086242752E-20			
5.42101086242752E-20		2.71050543121376E-20			
2.71050543121376E-20		1.35525271560688E-20			
1.35525271560688E-20		6.7762635780344E-21			
6.7762635780344E-21		3.3881317890172E-21			
3.3881317890172E-21		1.6940658945086E-21			
1.6940658945086E-21		8.470329472543E-22			
8.470329472543E-22		4.2351647362715E-22			
4.2351647362715E-22		2.11758236813575E-22			
2.11758236813575E-22		1.058791184067875E-22			
1.058791184067875E-22		5.293955920339375E-23			
5.293955920339375E-23		2.6469779601696875E-23			
2.6469779601696875E-23		1.3234889800848437E-23			
1.3234889800848437E-23		6.617444900424219E-24			
6.617444900424219E-24		3.3087224502121095E-24			
3.3087224502121095E-24		1.6543612251060547E-24			
1.6543612251060547E-24		8.271806125530274E-25			
8.271806125530274E-25		4.135903062765137E-25			
4.135903062765137E-25		2.0679515313825685E-25			
2.0679515313825685E-25		1.0339757656912842E-25			
1.0339757656912842E-25		5.169878828456421E-26			
5.169878828456421E-26		2.5849394142282105E-26			
2.5849394142282105E-26		1.2924697071141052E-26			
1.2924697071141052E-26		6.462348535570526E-27			
6.462348535570526E-27		3.231174267785263E-27			
3.231174267785263E-27		1.6155871338926315E-27			
1.6155871338926315E-27		8.077935669463157E-28			
8.077935669463157E-28		4.0389678347315785E-28			
4.0389678347315785E-28		2.0194839173657892E-28			
2.0194839173657892E-28		1.0097419586828946E-28			
1.0097419586828946E-28		5.048709793414473E-29			
5.048709793414473E-29		2.5243548967072365E-29			
2.5243548967072365E-29		1.2621774483536182E-29			
1.2621774483536182E-29		6.310887241768091E-30			
6.310887241768091E-30		3.1554436208840455E-30			
3.1554436208840455E-30		1.5777218104420227E-30			
1.5777218104420227E-30		7.888609052210114E-31			
7.888609052210114E-31		3.944304526105057E-31			
3.944304526105057E-31		1.9721522630525285E-31			
1.9721522630525285E-31		9.860761315262642E-32			
9.860761315262642E-32		4.930380657631321E-32			
4.930380657631321E-32		2.4651903288156605E-32			
2.4651903288156605E-32		1.2325951644078302E-32			
1.2325951644078302E-32		6.162975822039151E-33			
6.162975822039151E-33		3.0814879110195755E-33			
3.0814879110195755E-33		1.5407439555097877E-33			
1.5407439555097877E-33		7.703719777548938E-34			
7.703719777548938E-34		3.851859888774469E-34			
3.851859888774469E-34		1.9259299443872345E-34			
1.9259299443872345E-34		9.629649721936172E-35			
9.629649721936172E-35		4.814824860968086E-35			
4.814824860968086E-35		2.407412430484043E-35			
2.407412430484043E-35		1.2037062152420215E-35			
1.2037062152420215E-35		6.018531076210107E-36			
6.018531076210107E-36		3.0092655381050535E-36			
3.0092655381050535E-36		1.5046327690525267E-36			
1.5046327690525267E-36		7.523163845262634E-37			
7.523163845262634E-37		3.761581922631317E-37			
3.761581922631317E-37		1.8807909613156585E-37			
1.8807909613156585E-37		9.403954806578292E-38			
9.403954806578292E-38		4.701977403289146E-38			
4.701977403289146E-38		2.350988701644573E-38			
2.350988701644573E-38		1.1754943508222865E-38			
1.1754943508222865E-38		5.877471754111432E-39			
5.877471754111432E-39		2.938735877055716E-39			
2.938735877055716E-39		1.469367938527858E-39			
1.469367938527858E-39		7.34683969263929E-40			
7.34683969263929E-40		3.673419846319645E-40			
3.673419846319645E-40		1.8367099231598225E-40			
1.8367099231598225E-40		9.183549615799112E-41			
9.183549615799112E-41		4.591774807899556E-41			
4.591774807899556E-41		2.295887403949778E-41			
2.295887403949778E-41		1.147943701974889E-41			
1.147943701974889E-41		5.739718509874445E-42			
5.739718509874445E-42		2.8698592549372225E-42			
2.8698592549372225E-42		1.4349296274686112E-42			
1.4349296274686112E-42		7.174648137343056E-43			
7.174648137343056E-43		3.587324068671528E-43			
3.587324068671528E-43		1.793662034335764E-43			
1.793662034335764E-43		8.96831017167882E-44			
8.96831017167882E-44		4.48415508583941E-44			
4.48415508583941E-44		2.242077542919705E-44			
2.242077542919705E-44		1.1210387714598525E-44			
1.1210387714598525E-44		5.6051938572992625E-45			
5.6051938572992625E-45		2.8025969286496312E-45			
2.8025969286496312E-45		1.4012984643248156E-45			
1.4012984643248156E-45		7.006492321624078E-46			
7.006492321624078E-46		3.503246160812039E-46			
3.503246160812039E-46		1.7516230804060195E-46			
1.7516230804060195E-46		8.758115402030097E-47			
8.758115402030097E-47		4.3790577010150485E-47			
4.3790577010150485E-47		2.1895288505075242E-47			
2.1895288505075242E-47		1.0947644252537621E-47			
1.0947644252537621E-47		5.4738221262688105E-48			
5.4738221262688105E-48		2.7369110631344052E-48			
2.7369110631344052E-48		1.3684555315672026E-48			

Fig.III.19.-Espectro de R M N correspondiente a la segunda sustancia aislada en la columna cromatográfica.



MADE IN GREAT BRITAIN

5172

III.7. Cultivos con Naranja de Acridina.

Vista la comunidad antigénica que existe entre estas dos especies bacterianas, tan separadas taxonomicamente entre sí, quedaban en pié si este hecho, así como la evidencia de que la transformación del sustrato esteroide era positiva en presencia de Naranja de Acridina, nos sugirió la idea de que se pudiese deber a la presencia de algún factor extracromosómico, a algún episoma que transfiriese, por un lado los componentes antigénicos comunes a ambas bacterias así como, por otro lado, fuese el responsable de la transformación de los esteroides.

Para aclarar este punto, fue por lo que realizamos el cultivo de las bacterias en presencia de una sustancia que inhibiese la presencia de episomas, Naranja de Acridina, habiendo expuesto en el apartado II.1.3., siguiendo la técnica expuesta por Meynell, G. y Meynell, E., 1970.

Es conocido que las sustancias que inhiben la replicación del cromosoma bacteriano realizan también la inhibición de la replicación de episomas y plásmidos a menores concentraciones. Siendo la dosis utilizada para la inhibición de la replicación, de

los episomas autónomos entre 20 - 50 μg /ml. de Naranja de Acridina.

Los primeros cultivos realizados, siguiendo la concentración expuesta en la obra antes mencionada, de 25 μg . por ml., no nos dieron crecimiento bacteriano, por lo que dedujimos que el Naranja de Acridina estaba inhibiendo, tanto en *Arthrobacter* como en *Bacillus* la replicación del cromosoma bacteriano.

Fuimos rebajando la concentración de Naranja de Acridina, hasta conseguir un crecimiento positivo, que, en este caso concreto fue de 10 μg . por ml., primera concentración en que obtuvimos este crecimiento.

Estos cultivos eran, por lo tanto, las bacterias capaces de crecer a una máxima concentración de Naranja de Acridina, lo que descartaba en ellas la replicación del episoma y la transmisión de caracteres debidos a ellos. Otra eventualidad que puede darse es que estas bacterias fuesen una mutante seleccionada por la concentración elevada de Naranja de Acridina.

En este apartado expondremos los resultados obtenidos en la búsqueda de la posible existencia de episomas que fuesen responsables de la comunidad antigé

nica, mediante el enfrentamiento de los antígenos preparados a partir de los cultivos con Naranja de Acrídina, siguiendo, exactamente, los mismos pasos que para la preparación de los extractos antigénicos a partir de los cultivos normales. Apartado II.2., obteniendo, exclusivamente los extractos antigénicos para analizar. Ver fig. II.2.

Para la evidenciación de la posible existencia de episomas que fuesen responsables de la comunidad antigénica, realizamos los siguientes enfrentamientos mediante la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony, Apartado II.7.1., que resumimos en el esquema siguiente:

Antígeno A S E N frente a inmunosuero anti B S E

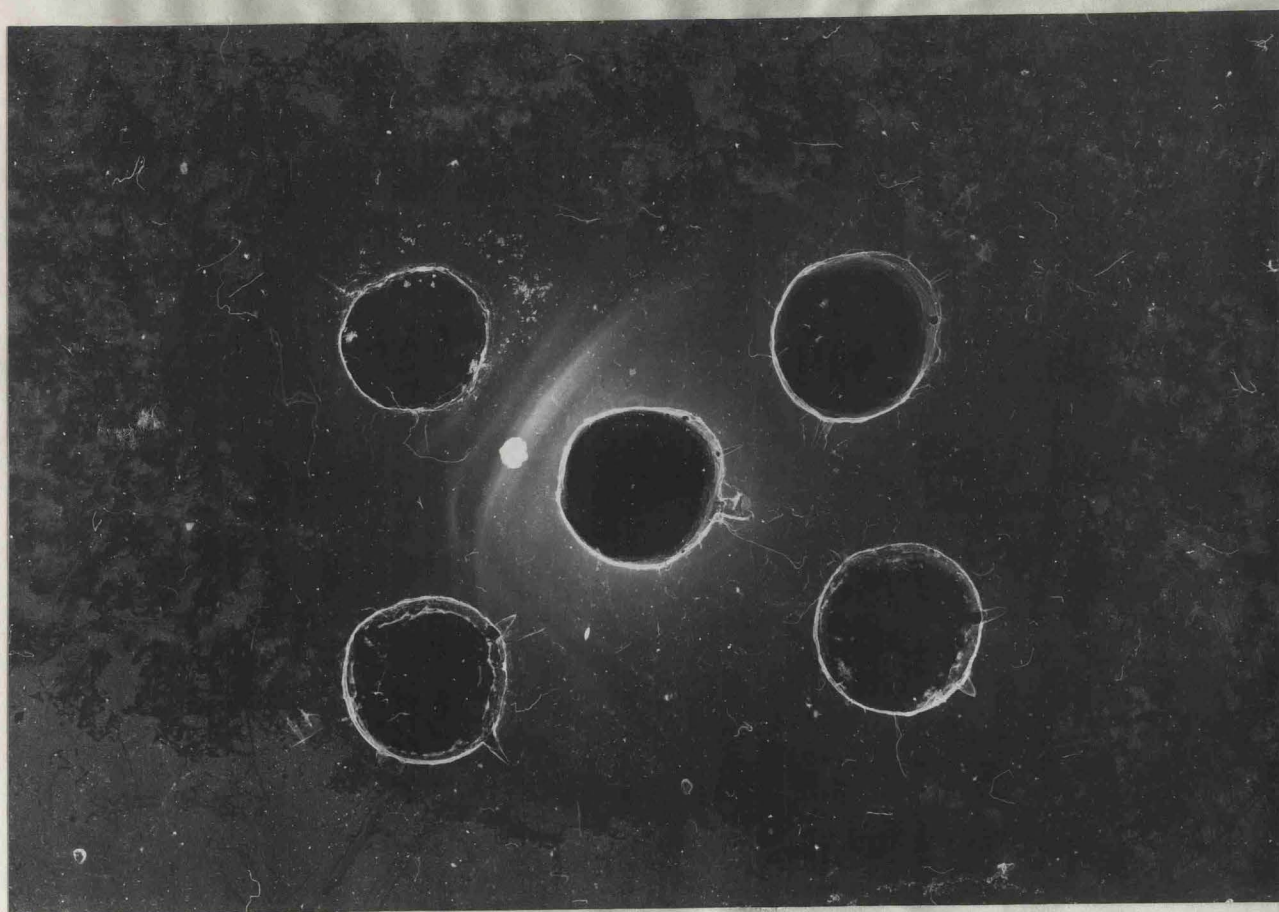
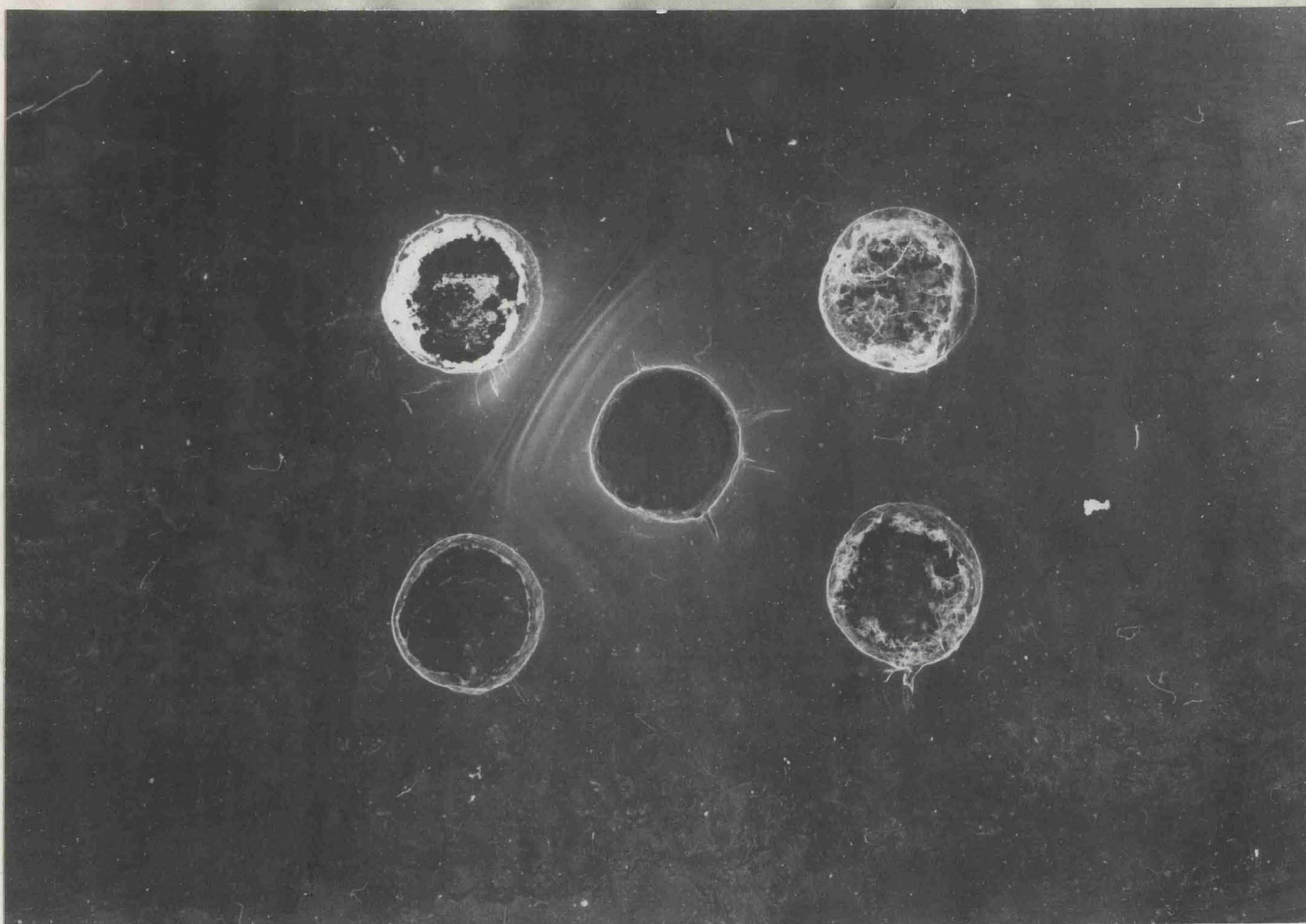
Antígeno A C E N frente a inmunosuero anti B C E

Antígeno B C E N frente a inmunosuero anti A S E

Antígeno B C E N frente a inmunosuero anti A C E

Los resultados obtenidos en estos enfrentamientos fueron totalmente negativos, no obteniéndose ninguna banda de precipitación en ninguno de ellos. Repetimos las inmunodifusiones, reforzando los pocillos mediante adiciones sucesivas de los distintos componentes de los enfrentamientos, pero nunca conseguimos

Fig.III.20.Fotografía correspondiente a los Ouchterlony en que se utilizaron como antígenos los correspondientes a los cultivos con naranja de acridina,mostrando reacción negativa.



positivar los resultados. Esto está representado en la Fig. III.20. que muestra los Ouchterlony correspondientes. Había que descartar si este resultado negativo era producido por una interferencia del Naranja de Acridina en la reacción Antígeno-Anticuerpo. Para ello quisimos repetir los enfrentamientos, pero mediante la adición "in vitro", del Naranja de Acridina a los preparados antigénicos obtenidos de manera normal, para lo cual los fraccionamos en dos partes, a una de las cuales añadimos Naranja de Acridina en la misma concentración que tenían en los medios de cultivo, 10 mcg., por ml. A estos antígenos los denominamos, respectivamente A S E + N, A C E + N, B S E + N y B C E + N. Con ellos repetimos los enfrentamientos, obteniendo los resultados siguientes:

1.- Enfrentamiento Antígeno A S E + N frente a inmunosuero anti B S E.

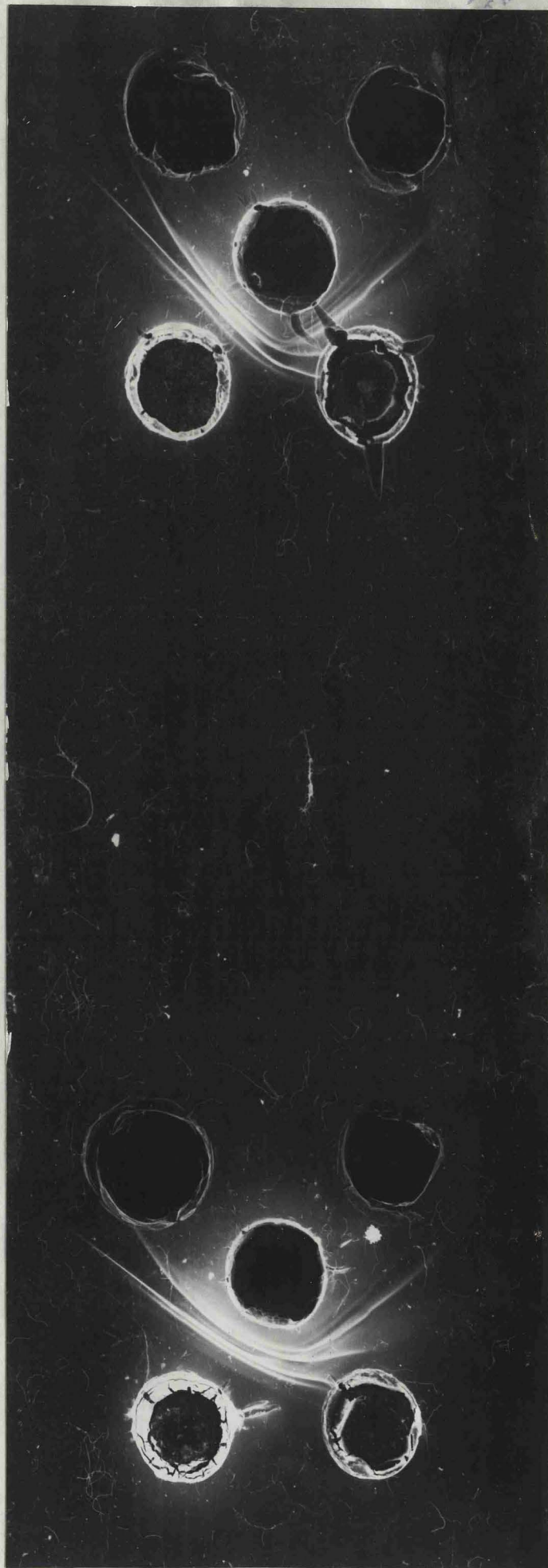
Obtuvimos hasta seis bandas de precipitación en los Ouchterlony correspondientes.

2.- Enfrentamiento Antígeno A C E + N frente a inmunosuero anti B C E.

Obtuvimos cuatro bandas de precipitación.

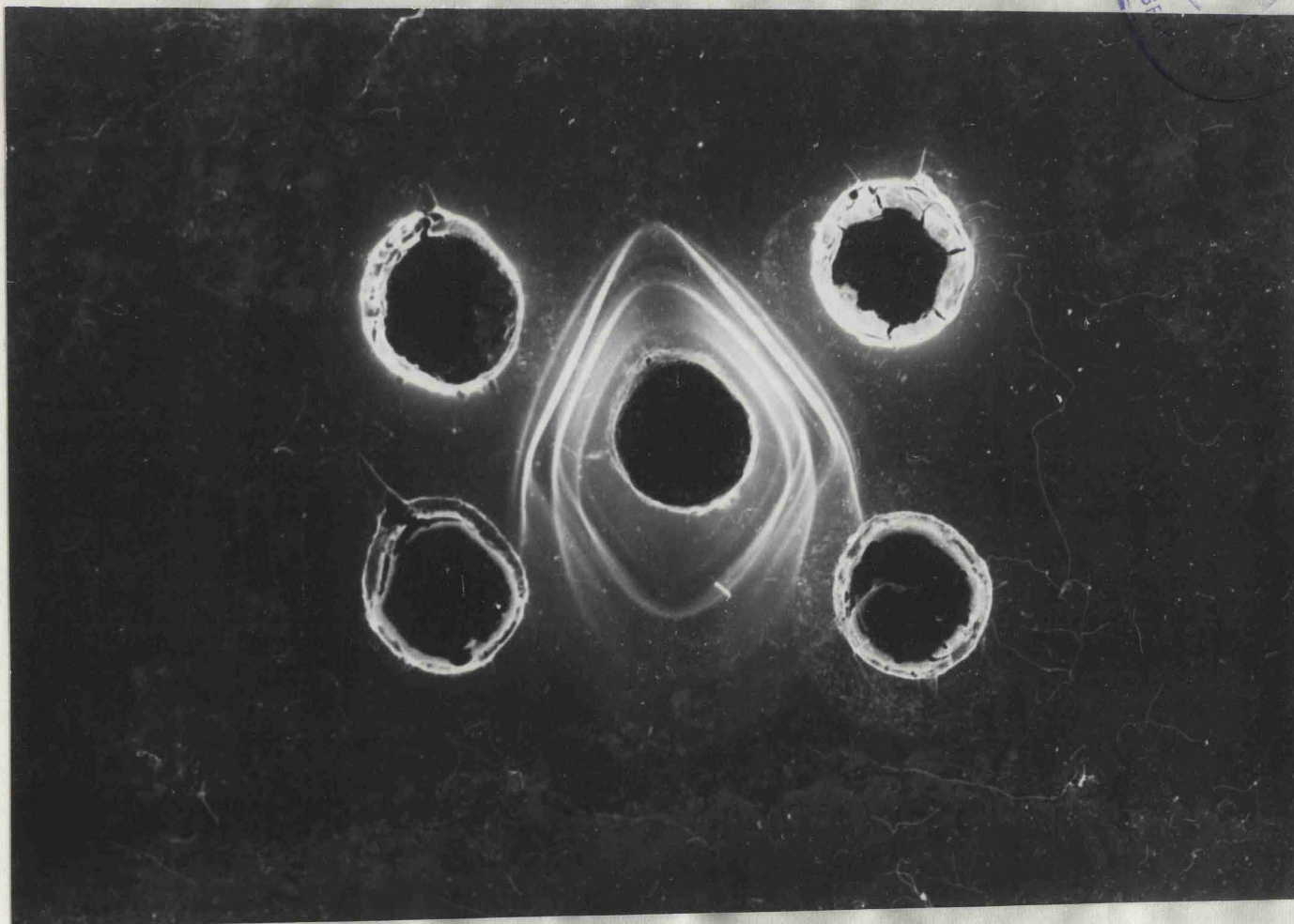
3.- Enfrentamiento Antígeno B S E + N frente

Fig.III.21.-Fotografía en que recoge la positividad de la reacción de los antígenos con naranja de acridina in vitro, frente a la reacción negativa de los antígenos con naranja de acridina in vivo.



HEAD OF PHARMACY
- MADRID -

Fig.III.22.Fotografía en que se recoge
la reacción positiva de los antígenos
normales y los antígenos con adición
de naranja de acridina in vitro.



a inmunosuero anti A S E.

Obtuvimos seis bandas de precipitación.

4.- Enfrentamiento del Antígeno B C E + N
frente a inmunosuero anti A C E.

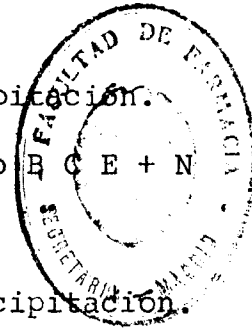
Obtuvimos cuatro bandas de precipitación.

Estos resultados están representados en las
fotografías de la Fig. III.21.

También realizamos un ensayo de identidad
de estas bandas, mediante un Ouchterlony en que en -
frentábamos los antígenos normales y los que conte -
nían Naranja de Acridina.

Los resultados, espuestos en la fotografía
de la Fig. III.22., nos mostraron, por un lado, tres
bandas de precipitación con reacción de identidad en,
tre los antígenos B S E y B S E + N. Cinco bandas de
precipitación con reacción de identidad entre los an
tígenos B C E y N C E + N. Dos bandas de precipitación
con reacción de identidad entre los antígenos B S E, y
B C E, y tres bandas de precipitación con reacción de
identidad entre los antígenos A S E + N y B C E + N.
Todos enfrentados con el inmunosuero anti B C E.

Los resultados obtenidos con los antígenos,



procedentes del *Arthrobacter* fueron exactamente iguales.

Todo ello indica que el Naranja de Acridina a estas concentraciones no interfiere la reacción inmunológica y que, por lo tanto, no pueden ser atribuidas a ello la falta de bandas con los cultivos obtenidos en presencia de esta sustancia. Quizá la única explicación a la falta de comunidad antigénica entre los cultivos realizados en presencia de Naranja de Acridina y sin ella, sea debido a la selección de un mutante cuyo cromosoma bacteriano no era inhibido a esta concentración.

El que fuese un mutante seleccionado, explicaría los resultados de los Ouchterlony de la falta de comunidad antigénica y explicaría también el por qué se sigue transformando el sustrato.

Lo que fue evidente de este estudio, es que el *Bacillus sphaericus* y el *Arthrobacter simplex* llevan a cabo la transformación tanto en ausencia como en presencia de Naranja de Acridina, aunque, antigénicamente la composición de ambos, en ausencia y en presencia de Naranja de Acridina, sea totalmente diferente.

IV. DISCUSION

DISCUSION.

En la realización de nuestro trabajo hemos partido de la base de que unas bacterias, bien conocidas en su actividad transformante, en las cuales se han descrito y aislado algunos sistemas enzimáticos, V. gr., la 3-Oxo- Δ^4 -esteroide- Δ^1 Oxidereductasa del *Arthrobacter simplex*, por Penase, y Bulieu, 1967; Penase y Peyre, 1968, entre otros. La deshidrogenación de algunos esteroides por el *Bacillus sphaericus*, Stefanovic y col, 1963; Ringold, y col, 1962, entre muchos otros, así como el conocimiento de que se habían estudiado y aislado muy diversos sistemas enzimáticos transformantes de esteroides, tanto en bacterias como en hongos.

En el estudio de los trabajos de Neseman y col. 1960; Schmidt-Thomé y col., 1962; Cinader y Lafferty, 1964; Vogel, 1967; Suzuki y col. 1969; Polichová, 1970; Avrameas, 1970; Cinader y col., 1971, entre otros muchos en que realizan un estudio exhaustivo de la dinámica enzimática, presencia de diversos sistemas, e inducción y represión en presencia de sustratos esteroides, así como la influencia ejercida por la presencia de anticuerpos específicos, que conllevan una activación de la actividad enzimática. No obstante hemos encontrado que los métodos

utilizados en este estudio estaban dirigidos a la identificación química de la presencia de estas sustancias.

Por todo ello, conociendo diversos trabajos en que se utilizaban sistemas biológicos en el estudio de componentes enzimáticos, mediante la producción de anticuerpos específicos en diversos animales de experimentación, conociendo la especificidad de estas técnicas, su extremada sensibilidad, el análisis inmunológico, especialmente dentro de las técnicas de inmunodifusión e inmunolectroforesis, v. gr., Chordi, y Kagan, 1964; Tormo y Chordi, 1965, así como las directrices seguidas en los numerosos trabajos de investigación inmunológica, como los de Arcos, 1966; Hermida, 1969; Lledias 1970; Martínez, 1966; Ortiz de Landázuri, 1970; Teijeira, 1972, etc., quisimos seguir este camino en la investigación de los mecanismos implicados en la transformación microbiana de esteroides ya que veíamos este camino inexplorado, con lo que marcaríamos una nueva ruta dentro de este campo tan estudiado bajo otros aspectos.

Como hemos visto en los Resultados, en el análisis antigénico del *Bacillus sphaericus*, hemos podido detectar por diferentes métodos, un total de 30

bandas de precipitación. Lógicamente no todas estas fueron encontradas por un análisis antigénico directo, solamente encontrábamos de esta forma un total de 20 bandas de precipitación. La sistemática seguida ha sido la de absorciones y comprobar que existían las diferentes bandas por diferentes métodos. Esta discordancia en el número de bandas que encontrábamos de manera directa del patrón total, depende de las proporciones de antígeno que se encuentran en el total de la muestra, los llamados por nosotros antígeno mayor y menor, aquellos antígenos que están en concentraciones suficientes para la formación de anticuerpos, pero no para precipitar. Esto explica el porqué de una forma encontrábamos unas bandas cuando utilizábamos el anticuerpo frente a un antígeno y en cambio no lo encontrábamos cuando utilizábamos otro antígeno, estando presente el anticuerpo en el inmunosuero.

No hemos sido capaces de encontrar en la Literatura ningún trabajo que haga un análisis completo de las proteínas de estos microorganismos ni siquiera de sus enzimas. El número de proteínas o enzimas que encontrábamos por los métodos inmunológicos, era dentro de los límites, del método que hemos encontrado en

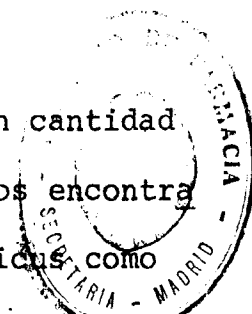
otras múltiples bacterias, Arcos, 1966. Tampoco hemos en-
contrado ningún estudio que se haya efectuado del *Baci-*
llus sphaericus y del *Arthrobacter simplex* y des-
pués de la inducción por el sustrato para la transforma-
ción de esteroides. El único dato que hemos podido reco-
ger es el estudio efectuado por Soda y cols. (1968), en el
cual aísla una leucina deshidrogenasa que purifica, y
posteriormente somete una electroforesis en gel de acrí-
lamida. No describe la movilidad electroforética absolu-
ta, ni tampoco, la movilidad electroforética relativa a
la albúmina. Sin embargo, por la fotografía que presen-
ta, parece ser una proteína lenta que, por otro lado,
describe esta enzima como constitutiva. Por la movili-
dad que presenta en la fotografía se deduce que debe te-
ner entre 15 y 30%. Nosotros hemos encontrado entre es-
tas movilidades una sola banda de movilidad 16. Todas
las demás eran mucho más lentas o más rápidas. Sin em-
bargo, debido al diferente enfoque de ambos estudios, es
difícil determinar la correspondencia, pero, podría tra-
tarse de la movilidad 16 encontrado por nosotros.

Respecto al análisis antigénico del *Bacillus*
sphaericus, tampoco hemos encontrado ninguna referencia
de un estudio antigénico de estas especies, si se había

efectuado con anterioridad un análisis antigénico del *Bacillus cereus*, en el cual se habían encontrado un total de 31 componentes, Arcos y Chordi 1969. Indiscutiblemente, al cambiar la especie, cambian las proteínas específicas, pero, sin embargo, hemos encontrado un número similar de componentes antigénicos. No nos interesaba determinar la comunidad con el *Bacillus cereus*, pero sí pudimos constatar que, al igual que en el anterior estudio de Arcos, se encontraba un gran número de proteínas con una movilidad electronegativa. Incluso en aquel estudio sobre el *Bacillus cereus*, llegaba hasta una movilidad de -31, nosotros hemos llegado a encontrar una de movilidad -23. Por otro lado, también , encontrábamos movilidades muy superiores a la de la albúmina hasta de 127 en nuestro estudio, cosa que también se encontraba en el estudio sobre el *B. cereus*. Es decir, que una de las características que nos llamaba la atención es que las proteínas del *Bacillus*, tenían un gran espectro. Oscilaban desde grandes movilidades, superiores a la de la albúmina, hasta movilidades electronegativas, proteínas electropositivas que emigraban hacia el polo negativo, cosa que también fue encontrada en el único estudio que nosotros conocemos efectuada

do sobre otra especie del Género Bacillus.

Quizá lo más destacado sea la gran cantidad de proteínas inducidas y reprimidas que hemos encontrado, tanto en el estudio del Bacillus sphaericus como en el de Arthrobacter simplex. Sobre todo nos llama la atención no las inducidas, sino las reprimidas. En el caso del Bacillus, encontramos seis proteínas entre las reprimidas y, en el caso del Arthrobacter, encontramos cinco. Sorprende esto porque otros trabajos de inducción por otros sustratos, v. gr., el escrito por Arcos y Chordi sobre Bacillus cereus, se encontraba que aparecían muchas inducidas, pero no se encontraban reprimidas cuando se añadía al sustrato una sustancia como la penicilina que, indiscutiblemente, era suficiente como para producir cambios abundantes. Aquí vemos una gran cantidad de reprimidas, es decir, que el efecto del sustrato esteroide produce un gran trans-torno en la constitución de las proteínas de las bacterias. Quizá sea esto debido a que el esteroide del sustrato interfiera con la fisiología de la bacteria. En cualquier caso llama la atención, como decíamos anteriormente, la cantidad de proteínas reprimidas existentes. Un número de autores ha sugerido que deben produ-



cirse muchos cambios cuando aparece en el sustrato un esteroide, posiblemente por un mecanismo de desdoblamiento en las bacterias, extremo que ha sido revisado por Stoudt, 1960. Sospecha que el sustrato esteroide, produce algún efecto sobre la respiración del cultivo bacteriano. Si esto fuese así efectivamente, se explicaría el por qué de estos cambios tan llamativos en reprimir cinco o seis de las treinta proteínas que detectábamos, aproximadamente un 20%. Por otro lado es conocida la acción de los sustratos esteroides sobre las células eucarióticas, sobre los tejidos de mamíferos. En este sentido, Lang, 1971, ha revisado la acción que puede tener sobre la represión e inducción sobre las células eucarióticas y piensa que los esteroides pueden actuar como enzimas, coenzimas o apoenzimas o que tengan efectos alostéricos o que actúen sobre la fermentación de nuevas enzimas o que actúen sobre la transcripción del D.N.A.

Sutherland, 1969 y Breuer, 1965, recientemente, han revisado la acción de los esteroides explicando que actúan como enzimas, coenzimas o apoenzimas y así explicar, de manera análoga, su acción sobre las bacterias, aunque todos estos trabajos se refieren a la acción de los esteroides sobre células eucarióti-

cas. También se ha estudiado que podía ser un efecto tan llamativo por efectores alostéricos, cosa que ha sido revisado por Yielding y Tomkins en 1958 en relación con la glutamato dehidrogenasa de los estógenos. Sea lo que fuere, lo que si es cierto es que en el caso de trabajar con un sustrato esteroide las acciones son mucho más llamativas y que los cambios son mayores de los que estamos acostumbrados a ver en otras bacterias, trabajando con otros sustratos.

Nosotros no conocemos si las enzimas causantes de la transformación del sustrato son enzimas constitutivas o inducidas. En la bibliografía, las enzimas, de las bacterias capaces de transformar esteroides, han sido descritas unas veces como constitutivas y otras veces como inducidas. Perlman y col., 1952 y 1955, encontró que en el *Streptomyces* eran inducidas, pero, Penasse y Baulieu, 1968, trabajando con *Arthrobacter simplex* y con el mismo sustrato, encontraba que la enzima 3-Oxo-esteroide Δ^4 - Δ^1 -Oxidorreductasa era inducida y todas las muestras que preparaban estos autores eran a partir de cultivos a los que añadían el sustrato. Según estos y en el caso del *Arthrobacter simplex*, las enzimas causantes de la transformación deber ser, o bien la

de movilidad 70, la de movilidad 100, la de movilidad 107 o la de movilidad 115, que son las únicas inducidas que nosotros encontrábamos en gran cantidad precisamente en esta cepa de *Arthrobacter*. Tenía que ser una de las doce inducidas que nosotros encontrábamos en esta especie bacteriana. Como estos autores no exponen la movilidad electroforética de este preparado aislado, nosotros no podemos determinar la posible correspondencia entre la enzima aislada por estos autores, y las proteínas inducidas encontradas por nosotros. Trabajos en marcha en el laboratorio, intentan determinar cuál de estas proteínas es la que tiene capacidad transformante mediante fraccionamientos en columna de cromatografía y determinación de la actividad enzimática transformante.

Pasamos a continuación al estudio de la comunidad antigénica que encontramos entre ambas especies bacterianas. Verdaderamente resulta muy sorprendente, el gran número de componentes antigénicos que encontramos comunes para especies tan separadas taxonómicamente separadas entre sí. Esta comunidad antigénica insólita entre dos especies taxonómicamente diferentes nos llamó la atención desde el principio. Las inmunoe-

lectroforesis cruzadas (antígeno y anticuerpo pertenecientes a microorganismos diferentes), daban igual o mayor riqueza en bandas que las homólogas (antígenos y anticuerpos del mismo microorganismo). Esto era reproducible. Es más, en algún caso se detectaba un mayor número de bandas por reacción cruzada de sistemas heterólogos que con la reacción directa con sistemas homólogos, v. gr., el antígeno A S E daba 10 bandas de precipitación directa con el inmunosuero anti B S E, mientras que este mismo antígeno daba sólo 9 bandas de precipitación con su homólogo el inmunosuero anti A S E. Los patrones antigénicos compuestos nos daban un total de 31 bandas antigénicas para el *Bacillus sphaericus*, 33 para el *Arthrobacter simplex* y, en cambio, por reacción cruzada detectábamos un total de 37 componentes antigénicos.

Quisimos, insistiendo en este punto, teniendo en cuenta esta comunidad, comprobar si existía comunidad antigénica con otros sistemas bacterianos que realizaran la misma transformación, por lo que procedimos al enfrentamiento de los inmunosueros procedentes de las bacterias anteriores *B. sphaericus* y *A. simplex*, en los dos aspectos de sin esteroides y con esteroides

enfrentándolos con los extractos antigénicos procedentes del *Pseudomonas dacunhae*, observando en las inmuno-electroforesis realizadas, la ausencia total de bandas de precipitación cuando empleábamos los inmunosueros anti A S E, anti B S E y anti B C E. Solamente cuando empleábamos el inmunosuero anti A C E, encontrábamos dos bandas de precipitación comunes, las de movilidades relativas 34 y 117.

En los enfrentamientos inmuno-electroforéticos realizados con los antígenos obtenidos a partir de los cultivos a los que adicionamos in vivo naranja de acridina con los inmunosueros procedentes de la inmunización de los conejos con los antígenos normales, los obtenidos a partir de los cultivos normales, encontramos una falta total de respuesta en lo referente a la aparición de bandas de precipitación. Véase Resultados, Apartado III.7, tanto cuando se utilizaba como inmunosuero el procedente del *Bacillus sphaericus* sin esteroides, como cuando se utilizaba el procedente de *B. sphaericus* con esteroides, como cuando se utilizaba el que procedía del *Arthrobacter simplex* sin esteroides, o el *A. simplex* con esteroides.

Estas experiencias las repetimos reiteradamen-

te ya que nos llamó poderosamente la atención este fenómeno, encontrando repetitividad en todos los ensayos efectuados, por lo que no podía tratarse de un artefacto, ya que cambiamos las condiciones experimentales, así como comprobamos por inmunodifusión según Ouchterlony, tanto en los enfrentamientos homólogos como los heterólogos en cuanto a sistema bacteriano.

Hubo un momento de nuestra investigación, por lo tanto, en que pensamos que esta falta de comunidad antigénica fuese debida a la acción inhibidora del naranja de acridina sobre la reacción antígeno anticuerpo, como algunos colorantes interfieren. Para ello se realizó el experimento de la simple adición in vitro al antígeno de B.sphaericus y A.simplex sin esteroides y con esteroides naranja de acridina y comprobar los resultados con antígenos sin naranja de acridina. Es decir, que con el fin de determinar si el naranja de acridina interfería la reacción antígeno-anticuerpo, se comparaba el antígeno obtenido de los Bacillus y Arthrobacter, cultivados in vivo sin naranja de acridina, con unos antígenos a los que se había añadido in vitro el colorante. El resultado fue la existencia de una comunidad antigénica completa entre los an-

tígenos sin y con acridina, es decir, que el colorante no interfería la reacción antígeno anticuerpo, y que se debía atribuir el efecto producido "in vivo" a alguna interferencia o efecto biológico de los conocidos por este colorante.

A la luz de estos resultados, pensando que el efecto no era "in vitro" sino "in vivo", sólo cabe interpretar que el naranja de acridina producía los ca racterísticos corrimientos del sistema de lectura, bien por la adición o la sustracción de una base y que por eso existían tantas diferencias entre la cepa original y la cepa mutada, ya que ninguno de los antígenos más importantes de la cepa original coincidía con la cepa mutada. Lo más sorprendente es que esta cepa mutada, con antígenos totalmente diferentes, era capaz de efec tuar la transformación de manera similar a como la rea lizaba la cepa original. En los enfrentamientos cruzados expuestos en el apartado III.5., nos encontramos con un total de 16 componentes constitutivos comunes, 10 componentes reprimidos comunes y 11 componentes in ducidos comunes. Esta comunidad antigénica es incom - prensible al tratarse de dos géneros diferentes. Es co nocado que el género *Arthrobacter* merece una revisión,

y que concretamente la especie con que nosotros trabajamos, el *Arthrobacter simplex*, presenta dificultades de clasificación. Copiamos aquí un párrafo de la publicación de Zagallo y Wang, 1962, en que expone esta problemática: "Conn, 1968, fue el primero en llamar la atención de la existencia en el suelo de una bacteria con un pleomorfismo muy marcado, en el sentido que cambia fácilmente de bacilo, en cultivos jóvenes, a forma cooide en cultivos viejos después de pasar por un elemental ciclo vital. Por ser morfológicamente similar a los *Corynebacterium*, Conn y Dimmick, 1947, proponen el nombre *Arthrobacter* para incluir en él los microorganismos pleomórficos del suelo, que, en contraste con los difteroides animales, licúan la gelatina, no producen ácido en la fermentación de los azúcares, son ureasa negativos y crecen bien sobre medios de cultivo sencillos, con fuentes inorgánicas de nitrógeno. El nuevo género fue recogido en la edición de 1957 del *Bergey's Manual*. No obstante, muchos microbiólogos opinan que los microorganismos globiformes procedentes del suelo no deben ser incluidos en el Género *Corynebacterium*. La posición taxonómica del género *Arthrobacter* está sujeta, aún, a muchas controversias. Lochhead y Burton 1957 y Lochhead

1958, que estudian la flora del suelo, aíslan y caracte-
rizan varias especies bacterianas de las que algunas re-
quieren aminoácidos, así como otras dependen de diver-
sos factores nutritivos para su crecimiento óptimo. Al-
gunas especies son asignadas al género *Arthrobacter* por
su similitud morfológica, aunque presenten grandes dife-
rencias nutricias entre sí. En la edición de 1957 del
Bergey's Manual, están recogidas nueve especies de *Ar-
thrbacter*".

Recientemente, Skyring y Qyadling, 1970, han
realizado un estudio sobre el *Arthrbacter*, así como
Katznelson y Mason, 1962 y Cummins y Harris, 1959, so-
bre la posición taxonómica del *Arthrbacter*. En todos
los estudios destaca que dentro del género *Arthrbacter*,
están comprendidas una gran cantidad de cepas con mu-
chas diferencias entre sí, especialmente teniendo en
cuenta, la proporción de Guanina-Citosina, oscila entre
las especies de *Arthrobacter* desde un 40% hasta un 70%.
Esto indica que muchas especies clasificadas dentro de
este género pueden no estar interrelacionadas.

De manera similar pasa con el *Bacillus*, el
cual es el ejemplo típico de estar incluidas dentro del
mismo género especies no relacionadas entre sí. Es cono-

cido que el contenido de Guanina-Citosina dentro del género *Bacillus* oscila ampliamente entre 32 y 50% ¹⁰ que también indica que la composición de bases en el género *Bacillus* es heterogénea e indica que muchas especies clasificadas dentro de este género pueden no estar relacionadas entre sí.

En el trabajo de Skyring y Qualing es precisamente el *Arthrobacter simplex* el que da un índice mayor de Guanina-Citosina, un 74%. Sorprende esta cifra tan alta que se asemeja a las que presentan las especies de *Nocardias*, *Streptomyces* y algunos *Micrococos*, pero muy diferente de los que presentan otras especies del género *Arthrobacter*. Es decir que de la bibliografía existente, es conocido que las dos bacterias pertenecen a dos géneros cuya revisión taxonómica parece indicada, porque es inexplicable que tengan tanta heterogeneidad ambos géneros. Sin embargo, esto no nos explica el por qué encontramos tanta comunidad antigénica entre ambas bacterias. Precisamente el único estudio que hemos podido encontrar en que esté expuesta la composición de bases Guanina-Citosina ha detectado una cifra muy elevada del 74%, cosa que no es encontrable nunca en el género *Bacillus*. Nosotros no hemos detectado en nuestras cepas el contenido

en Guanina-Citosina, ni tampoco conocemos qué cifra tiene el *Bacillus sphaericus*, pero este género siempre tiene unas cifras que nunca son superiores al 55%, es decir que tampoco es probable que en nuestras cepas exista una relación en el contenido Guanina-Citosina, que pueda explicar el por qué de esta comunidad antigénica.

Por otro lado un estudio inmunológico realizado por Cummins, 1961, sobre el *Arthrobacter* no se encontró, como era de esperar, al tener el *A. simplex* una cantidad de Guanina-Citosina del 74%, parecida a la que tienen las *Nocardias*, *Streptomyces* y *Sacharomyces*, una comunidad antigénica entre el *Arthrobacter simplex* y otras especies de *Mycobacterium*, que tiene precisamente esta proporción entre 70 y 80%, *Streptomyces* y *Actinomyces*, lo que pone en duda que exista una interrelación entre Inmunología y la proporción Guanina-Citosina.

En resumen, no podemos explicarnos el por qué de esta comunidad antigénica desde el punto de vista taxonómico, aunque es cierto que, tanto el género *Bacillus* como el *Arthrobacter* son géneros que comprenden especies muy heterogéneas, que deben reagruparse y subdividirse, probablemente en nuevos géneros. En cualquier caso existen muchas diferencias en el contenido Guanina-Ci

tosina entre las dos especies que hemos utilizado en nuestro trabajo, aunque, en el caso del *Arthrobacter simplex* se encuentren relaciones inmunológicas con bacterias que tengan proporciones similares a las suyas de Guanina-Citosina.

La única explicación sería la existencia de un episoma, que por las circunstancias que fuesen, pudiese transferirse entre estas dos bacterias, aún siendo taxonómicamente lejanas. Stoker y col., 1960, describen la comunidad antigénica entre diferentes especies de *Salmonella* transmitida por episomas y por fagos. Así, el antígeno que ellos denominaban 1 era capaz de transferirse de una *Salmonella* a otra, incluso, de diferentes grupos. Amano y col., 1958, Ørskov y Ørskov, 1961, Sneath y Lederberg, 1961, encuentran que los antígenos específicos de superficie de las bacterias Gram negativas, así como las colicinas pueden ser transferidas por replicones o plásmidos entre especies diferentes dentro de la misma familia Enterobacteriaceas. Estos autores explican que lo que se transfiere, es la estructura de superficie, la cual es controlada por estos plásmidos aislados y que, con toda probabilidad, contribuyen a las propiedades antigénicas que

transfiere. Ellos también encuentran que estos replicones pueden estar en el estadio de asociación con el cromosoma bacteriano o no. De tal forma, que Braun en 1966, revisando este tema concluye que la mayoría de los elementos genéticos clasificados como episomas tienen determinantes que causan cambios antigénicos en las bacterias.

Puede parecer extraño que en nuestro caso se tratase de dos especies diferentes, pertenecientes a dos familias también diferentes. Es conocido el fenómeno denominado restricción controlada por el huésped del A D N extraño. Sin embargo existen ejemplos de la existencia de transmisión de bacteriófagos o de plásmidos entre especies muy diferentes. Así, por ejemplo, el factor de transmisión de resistencia, R T F, que transmite la resistencia a la estreptomycin, cloramfenicol, tetraciclina, y sulfonamida, puede transferirse no sólo entre las Enterobacteriáceas, sino a especies filogenéticamente muy distantes, como pertenecientes a los géneros Vibrio, Pasteurella, Serratia y Pseudomonas, Watanabe, 1963, Meynell, Meynell y Data, 1968. Por eso no parece descabellado pensar en la transferencia de estos elementos genéticos entre estas dos bacterias

aunque fuesen pertenecientes a dos géneros filogenéticamente distantes. Esta interpretación fue la causa de los estudios que realizamos con estas bacterias en presencia de Naranja de Acridina.

Es conocido que el Naranja de Acridina pertenece a un grupo de colorantes que originan específicamente mutaciones por corrimiento del sistema de lectura. Estos colorantes son moléculas capaces de insertarse entre dos partes de bases del DNA. Durante la replicación puede insertarse una base extra donde está localizada la acridina, alargando el DNA en una base y corriendo el sistema de lectura. De manera alternativa, la presencia de esta acridina puede inhibir la incorporación de una base que en otras condiciones o en condiciones normales se insertaría. El DNA, por consiguiente, queda cortado en una base, lo que ocasiona un corrimiento del sistema de lectura. Siempre las acridinas originan mutaciones de este tipo, ocasionando bien la adición o la sustracción de una base lo que hace que exista un corrimiento del sistema de lectura y muchas enzimas o proteínas estén alteradas.

La aplicación a los plásmidos proviene de que se conoce que la replicación de un plásmido autóno

mo es inhibida mucho más que la replicación del DNA de las bacterias. De tal forma que al ser el plásmido ^{ADN} sea intracelular o extracelular su replicación se inhibe de manera selectiva. Por esta razón seleccionamos , dentro de las acridinas, el Naranja de Acridina. Los experimentos se realizaron a diferentes concentraciones hasta que conseguimos la máxima cantidad de Naranja de Acridina que permitía el crecimiento de la bacteria. Las bacterias que crecieron en estas condiciones, tanto en presencia como en ausencia del sustrato fueron analizadas como dijimos en Resultados. Nos encontramos que las bacterias que crecieron en presencia de Naranja de Acridina, efectuaban la transformación del sustrato esteroide, la Sustancia S de Reichstein, con lo cual indicaba que el naranja de acridina no inhibía la transformación de esteroides, pero, por el contrario, pudimos encontrar que las bacterias crecidas en presencia del Naranja de Acridina, inmunológicamente eran diferentes de las bacterias crecidas en su ausencia, tanto se existía sustrato como si no estaba presente. Esto parece indicar que existió una mutación o un corrimiento de bases en lo que a antígenos se refiere.

En nuestros experimentos vimos que cuando añadíamos Naranja de Acridina al sustrato la bacteria que;

crecía producía la transformación de tal forma que el producto final, separado y analizado por cromatografía y determinación de sus constantes químicas y espectroscópicas, era exactamente el mismo que cuando se utilizaba un cultivo sin la adición de Naranja de Acridina. Esto demostraba que en estas concentraciones de Naranja de Acridina, que eran las máximas viables, para el crecimiento de las bacterias, no existía, por lo tanto, ninguna posibilidad de transmisión de esta capacidad transformante, por medio de un plásmido. Sospechamos de los resultados del análisis antigénico que pudo tener lugar una mutación, es decir, que la concentración del Naranja de Acridina fué lo suficientemente intensa, no sólo para inhibir o alterar la replicación del plásmido, sino para alterar y efectuar un corrimiento en el ADE de la bacteria.

El análisis antigénico de las bacterias cultivadas en presencia del Naranja de Acridina, mostraba una composición antigénica totalmente diferente de las bacterias cultivadas en ausencia de dicho colorante, tanto cuando se encontraba presente el sustrato en el medio de cultivo, como cuando carecía de él. La evidencia era clara de que la presencia del Naranja

de acridina modificaba la actividad de estas bacteras, aunque no modificaba su capacidad transformante, porque el producto final seguía siendo el mismo. Estos resultados eran tan evidentes que en los Ouchterlony realizados utilizando los antígenos procedentes de los cultivos sin Naranja de Acridina obteníamos siete bandas de precipitación, mientras que en los realizados con los antígenos obtenidos a partir de los cultivos con Naranja de Acridina, en el caso del Arthrobacter simplex y del Bacillus sphaericus sin esteroides, no obteníamos ninguna banda de precipitación. Lo mismo nos pasaba con los antígenos obtenidos a partir de los cultivos en presencia del sustrato esteroide.

Es decir, las enzimas causantes de la transformación, al no ser modificadas por la presencia del Naranja de Acridina, a diferencia de los determinantes causantes de la antigenicidad, sólo podría explicarse por alguna de las siguientes posibilidades:

a) Que el corrimiento de las bases no afectó al gen de la enzima transformante y que ésta no está en suficiente cantidad para dar bandas de precipitación, o no tiene suficiente antigenicidad.

b) La supresión en bloque de las enzimas an

tigénicas.

c) Una reversión por mutación al gen primitivo de la enzima transformante.

La primera posibilidad no parece probable debido a que la cantidad de enzima que se produce en la transformación es elevado. Soda y col., 1971, en su trabajo sobre la L-Leucín deshidrogenasa, obtiene una cantidad de esta enzima que se aproxima a 64 micogramos por mililitro, cifra que es más que suficiente para determinar precipitación inmunológica, máxime en las condiciones que preparamos los antígenos, en que concentramos 50 veces las proteínas. No se determinaron en nuestro trabajo la concentración de unidades de actividad específica por mililitro de antígeno a analizar, pero, de acuerdo con los trabajos del autor antes mencionado, en condiciones análogas, nosotros debíamos obtener 120 unidades de actividad específica por ml. de antígeno, lo que equivale a 768 microgramos de enzima purificada por ml. La inmunolectroforesis es capaz de detectar dosis de antígeno comprendidas por encima de 20 microgramos por ml. Todo ello indica que nos encontramos en condiciones de concentración más que suficiente para ser detectadas por métodos inmunológicos.

Tampoco creemos que sea debido a insuficiente antigenicidad. La enzima aislada por Soda tiene 9S y un peso molecular de 280.000, lo que indica una buena antigenicidad.

Tampoco parece probable la posibilidad B, de una supresión en bloque de las enzimas antigénicas, unas 30, muy diferentes en peso molecular y muy diferentes en estructura. Parece casi imposible que estuviesen todas reunidas en un solo locus para que se diese la supresión en bloque.

Lo que parece más probable es la tercera posibilidad, que se trate de una reversión. Los datos que tenemos del experimento en que se añadió Naranja de Acridina parecen indicarlo. El sustrato se añadió a la población que crecía en presencia de Naranja de Acridina cuando esta población era de 10^6 bacterias por ml. Esto indica una población con un posible alto número de mutantes. Asimismo, el experimento mostró, desde el punto de vista cuantitativo, que la transformación fue menor que cuando la realizábamos en ausencia del Naranja de Acridina, lo que indica que no todas las bacterias producían la transformación o que no la producían con la misma intensidad. La presencia del

sustrato en el medio de cultivo impone, sin ~~ninguna~~ ^{ninguna} duda, una presión selectiva hacia un mutante ~~que sea~~ ^{que sea} capaz de utilizarle.

También apoya esta tercera ~~posibilidad~~ ^{posibilidad} los conocimientos que existen en la bibliografía sobre la función de la transformación de esteroides en la fisiología de los microorganismos. Existen dos explicaciones como dijimos más arriba. Capek y col., 1957, revisaron los trabajos mediante los que se sugería un posible mecanismo de destoxificación, pensando que el sustrato esteroide tenía un efecto tóxico sobre el metabolismo y no así el producto final. La otra explicación, cuyo trabajo principal es el realizado por Dodson y col., 1958, en el que explica este mecanismo por la facilidad de las bacterias de utilizar esteroides como fuentes de carbono. Precisamente, nuestro medio de cultivo, para la transformación de esteroides, es un medio limitante en fuentes de energía, ya que sólo contenía el sustrato y 1 gramo de extracto de levadura por litro.

En ambos casos podríamos ~~casos podríamos~~ ^{casos podríamos} encontrarnos en condiciones de selección de mutantes, bien porque en el primer caso de un mecanismo de destoxi

toxificación nos encontraríamos en un caso de coincidencias selectivas absolutas en que crecerían preferentemente la cepa que diera lugar a una segunda mutante con reversión al gen primitivo, productor de la enzima transformante. Esta posibilidad cabe, como decíamos antes, por la probabilidad de que en una población de bacterias de 10^6 a 10^8 , existan microorganismos mutados, a los que se les añadió un sustrato que podían transformar.

La utilización de esteroides como fuente de carbono también sería una condición selectiva aunque relativa. En este caso las presiones de la población pueden actuar como mecanismo selectivo dada la limitación de fuentes de energía. La población mutada sin capacidad transformante tendría un tiempo de duplicación más pequeño que una segunda mutación con capacidad de aprovechar el sustrato como fuente de energía. Esta condición originaría el reemplazamiento de los miembros de la primera mutación por los mutantes segundos con un mayor índice de crecimiento, como ha sido demostrado por Ecker y Lockhart, 1961 y revisado por Braun, 1966.

Sea cual sea el mecanismo que la transformación de esteroides suministre al microorganismo, desti-

toxificación o fuente de carbono, existen condiciones ambientales que conducen a unas condiciones selectivas de mutantes con capacidad de producir la transformación. Más aún, si la adición del sustrato se realiza cuando la población es abundante y el número de mutantes mayor, como fueron nuestras condiciones. Todo lo anterior parece indicar que en los experimentos con Naranja de Acridina nos encontramos con una reversión del gen causante de la transformación y que debido a las presiones selectivas no afectó más que a este gen determinado, diferenciándolo al resto de las proteínas antigénicas del microorganismo.

Sin embargo, esta reversión fue sólo funcional, debido a que se recuperaron las funciones de transformación por moléculas de diferente antigenicidad, de esta enzima concreta, lo que parece indicar que no nos encontramos en un caso de reversión verdadera causante de la transformación, sino de una reversión a una enzima con la misma función pero con diferente forma molecular. Sólo de esta forma nos podemos explicar que no haya ninguna banda de comunidad antigénica, correspondiente a estas enzimas, en los cultivos antes y después de la adición del Naranja de Acridina.

dina.

Esto es evidente, dada la cantidad de enzi-
mas transformantes que tenemos por ml., que existe
una transformación por molécula de diferente antigeni-
cidad en los cultivos con y sin el agente mutágeno Na-
ranja de Acridina. Lo cual coincide con los datos
existentes en la literatura de la inespecificidad de
la acción transformante. Parece por lo tanto bastante
improbable que la falta de especificidad en cuanto a
especie corresponda también a una falta de especifici-
dad en cuanto a la forma de llevarla a cabo. En nues-
tras experiencias, la misma transformación era realiza-
da por dos formas moleculares inmunológicamente dife-
rentes.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

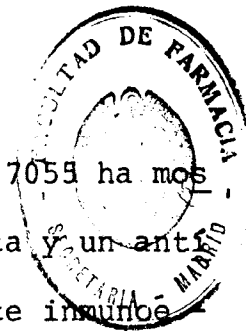
1.- El *Bacillus sphaericus* ATCC 7059 ha mostrado una composición antigénica de treinta y un antígenos inmunológicamente diferentes mediante inmunoelectroforesis con inmunosueros homólogos.

2.- La adición del sustrato, Sustancia S de Reichstein, ha permitido determinar que de los treinta y un componentes antigénicos totales, veinte son constitutivos, cinco son inducidos, y seis reprimidos por la acción del sustrato.

3.- De forma similar se ha determinado la composición antigénica total del *Arthrobacter simplex* ATCC 6946, mostrando un total de treinta y tres antígenos inmunológicamente diferentes, mediante el empleo de inmunoelectroforesis con inmunosueros homólogos.

4.- La adición del sustrato, Sustancia S de Reichstein, ha permitido determinar que de los treinta y tres componentes antigénicos totales, diez y seis son constitutivos, doce son inducidos y cinco reprimidos por la acción del sustrato.

5.- El estudio de la comunidad antigénica entre estas dos especies bacterianas, que realizan la



misma transformación del sustrato, ha permitido caracterizar, mediante inmunolectroforesis con inmunosueros heterólogos, treinta y siete antígenos comunes, de los que diez y seis son constitutivos, once son inducidos y diez son reprimidos.

El número de antígenos comunes, detectados por sistemas heterólogos, es mayor que la composición antigénica de cada cepa detectada por sueros homólogos.

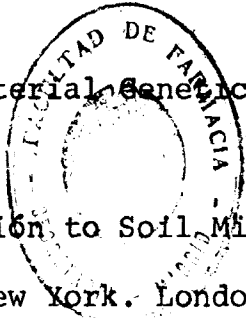
6.- Los cultivos realizados en presencia de Naranja de Acridina para descartar la posibilidad de un episoma como causa de la comunidad antigénica y de la transformación, mostraron poseer la misma capacidad transformante, pero distinta antigenicidad. Se descarta de esta manera la posibilidad de la relación de la actividad transformante con un episoma.

7.- Se demostró la misma actividad transformante del sustrato con las cepas originales del *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 y *Arthrobacter simplex* ATCC 6946 y las mutadas por la acción del Naranja de Acridina.

8.- El diferente comportamiento en la antigenicidad de las cepas originales y las mutadas por

la acción del Naranja de Acridina, pero no en su activi
dad enzimática, indica que la transformación no sólo es
inespecífica de especie sino que también es llevada a
cabo por enzimas inmunológicamente diferentes.

VI. BIBLIOGRAFIA.

- 
- 1.- Adelberg, E.A., "Papers on Bacterial Genetics", Little Brown, Boston, 1966.
 - 2.- Alexander, M. 1967. "Introducción to Soil Microbiology". John Wiley & Sons, Inc, New York. London Sidney.
 3. Amand, T., Goebel, W.F., Smid, E. M., J. Exp. Med. 108 , 731, 1958.
 4. Arcos, J.M., Chordí, A. Microbiol. España. 22, 139, 1969.
 - 5.- Arcos, J.M., Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias, Universidad de Valladolid, Nov., 1966.
 - 6.- Avrameas, S. Bull, Soc. Chim. Biol., 1968, 59 (5-6); 169-79 (Fr).
 - 7.- Avrameas, S. "Inh. Rer. Cytol.", 27, 349, 1970.
 - 8.- Bernstein, S., Feldman, L.I., Allen, W.S., Blank, H. R. Linden, C.E. Chem. & Ind. 4, 111-112, 1956.
 - 9.- Boyd, W.C., "Fundamentals of Immunology" 4th, Ed. 1966, John Wiley & Sons, Inc., 1966.
 - 10.- Braun, W., "Bacterial Genetics", 2nd. W.B. Saunders Co. Philadelphia & London, 1966.
 - 11.- Breuer, H. "Mechanism of Hormone Action". Stuttgart: George Thieme, 1965.

- 12.- Campbell, A.M., "Episomes". Harder & Row, Publishers. New York, Eranston, and London., 1969.
- 13.- Caper, A. Hanc, O., Malikorá, E. Ceskoslov. mikro-biol, 2, 286, 1957.
- 14.- Chang, V.M., Ikler, D.R. Can, J. Biochem. Physiol. 39, 1277, 1961.
- 15.- Charney, W. y Herzog, H.L.; "Microbial Transformations of Steroids". Academic Press, New York, 1967.
- 16.- Chordi, A. Clez, J. Tormo, J. Díaz, R. Rev. Med.E. G. Navarra, 6: 27, 1962.
- 17.- Chordi, A. Kagan, I.G.J., Immunol, 93, 439, 1964.
- 18.- Cinader, B. Ann. N.Y. Acad. Sci., 103, 495, 1963.
- 19.- Cinader, B. "Antibodies to Biologically Active Molecules: Proceeding Meeting of Hn FEBS". Viena, 21-24, April, 1965; Vol, 1 pl. 85, Ed. By Cinader, B. Pergamon Press, Oxford, 1966.
- 20.- Cinader, B. "Regulation of the Antibody response". Ed. by B. Cinader, Charles, C. Thomas, Springfield, Iel., 1968.
- 21.- Cinader, B. y Lafferty, K.J. INmunology, 7, N^o. 4, 342, 1964.
- 22.- Cinader, B. Suzuki, T. Pilichova, H., J. Immunol., 106 (5), 1381, 1971.



- 23.- Colingsworth, D.R., Brunner, M.P. y Haines, W.J.,
J. Am. Chem. Soc. 74, 2381, 1952.
- 24.- Conn, H.J. y Dimmick, I., J. Bact.: 54, 291, 1947.
- 25.- Cummis, C.S.J. Gen. Microbiol. 28, 35, 1962.
- 26.- Cummins, C.S. y Harris, H. Nature (London), 184,
831, 1959.
- 27.- Davis, B.D., Dulbecco, R. Eisen, H.N. Ginsberg,
y Wood, W.B., Jr. "Tratado de Microbiología",
Salvat Editores, S. A. Barcelona, 1972.
- 28.- Dodson, R.M. y Muir, R.D., J. Am. Chem. Soc., 80,
5004, 1958.
- 29.- Dodson, R.M., y Muir, R.D., J. Am. Chem. Soc, 80,
6148, 1958.
- 30.- Dulaney, E.L., Stapley, E.O., Hlavac. Ch. Mycolo-
gya, 47, 4640474, 1955.
- 31.- Eckert, R.E. y Lockhart, W.R., J. Bach, 82, 80,
1961.
- 32.- Fincham, J.R.S., "Genetic Complementation". Benja-
min, New York, 1965.
- 33.- Fischer, F.G. "Newer Methods of Preparative Orga -
nic Chemistry". Wiley (Interscience), New York,
1948.
- 34.- Fried, J. Green, M.J., Nair, G.V., J. Am. Chem.Soc.
92, (13), 4136, 1970.

- 35.- Fried, J. Thoma, R.N., Gerke, J.R., Herz, J.E. Dorum, M.N., Periman, D. J. Am. Chem. Soc. 74, 3962, 1952.
- 36.- Fried, J., Thoma, R.N., Clingsberg, A. J. Am. Chem. Soc., 75, 5764, 1953.
- 37.- Gale, P.H., Page, A.C., Stoudt, T.H., Fol. Ders, K. Biochemistry, 1, 788, 1962.
- 38.- Garro, J. Tesis Doctoral, Fac. de Med. Unir. de Navarra, Marzo, 1972.
- 39.- Gillespie, D.C., Can. J. Microbiol., 9, 509, 1963.
- 40.- Gillespei, D.C., Can, J. Microbiol., 9, 515, 1963.
- 41.- Gunsalus, I.C. y Stanir, R.Y., "The Bacteria" Acad. Press, New York, 1964.
- 42.- Haurowitz, F. "Immunochemistry and the Biosynthesis of Antibodies". John Wiley & Sons, 1968.
- 43.- Hayes, W. "Function and Structure in Microorganims". (XV Symposium, Society of General Microbiologist, M.R. Pollock and M.H. Richmond, Eds.). Cambridge University Press, London, 1965.
- 44.- Hayes, W., "The Genetics of Bacteria and Their Viruses". 2nd. Ed. Blackwell Scientific Publications Oxford an Edinburgh, 1970.
- 45.- Hench, P.S. Kendall, E.C., Slocub, C.M., Polley, H.F. A.M.A. Arch, Internal. Med., 85, 545, 1950.

- 46.- Hermida, F.J. Tesis Doctoral, Fac. de Med. Unir.
de Navarra, Mayo, 1969.
- 47.- Herzog, H.L., Payne, C.C. Tetrahedron, 18, 581,
1962.
- 48.- Herzog, H.L., Payne, C.C., Jeunik, M.A., Gould, D.
Shapiro, E.L. Oliveto, E.P., Hershberg, E.B.J. Am.
Chem. Soc., 77, 4781, 1955.
- 49.- Hubener, H.J., y Sahrholz, F.G., Biochem 2., 333,
95, 1960.
- 50.- Iizuka, H. Naito, A. Sato, Y. J. Gen. Appl. Micro
biol, (Japan), 7, 118, 1961.
- 51.- Iizuka H. y Naito, "Microbial Transformations of
Steroids and Alkaloide". Ed. por University of To
kyo, Press y por University Park Press, State, Co
lleg. Penn. U.S.A., 1967.
- 52.- Jacob, F. Wollman, E.L. "Sexuality and the Gene -
tics of Bacteria". Academic Press, New York.,
1961.
- 53.- Katznelson, H. Mason, A. Can. J. Microbiol., 8,
588, 1962.
- 54.- Kawahara, F. S. y Talalay, P.J. Biol. Che. 235,
1960.
- 55.- Kawahara, F.S. Wang, S.F. y Talalay, P.J. Biol.
Chem. 237, 1500, 1962.

- 56.- Koepsell, H.J. Biotechnol, Bioeng, 4, 57, 1962.
- 57.- Kondo, E. y Masuo, E.J. Agr. Chem. Soc. (Japan),
34, 759, 1960.
- 58.- Kondo, E. y Masuo, E.J. Agr. Chem. Soc. (Japan),
34, 847, 1960.
- 59.- Kondo, E. Masuo, E. Ann. Repts, Shionogi, Res.
Lab., 12, 157, 1962.
- 60.- Kwapinski, J.B.G., "Analytical Serology of Micro-
organisms", 1969. Interscience Publishers, New
York, London, Sydney, Toronto, 1969.
- 61.- Lang, N. Biochem. Soc. Symp. 1971, 32, 85-150,
1971.
- 62.- Lochhead, A.G., Arch. Microbiol., 31, 163, 1958.
- 63.- Lochhead, A.G., y Burton, M.O. Canad, J. Micro -
biol, 3, 35, 1957.
- 64.- Lledias, M.T. Teis Doctoral, Fac. de Medicina.
Univ. de Navarra, Nov., 1970.
- 65.- Mamoli, L. y Vercellone, A. Ber., 70, 470, 1937.
- 66.- Martínez, J.M. Tesis Doctoral, Fac. Med. Univ. de
Navarra, Nov., 1966.
- 67.- Martínez REja, P. Álvarez Moreno, C. Hermida, F. y
Chordi, A., J. Dairy Sci., 52,1, 1969.
- 69.- Meynell, F.F.Meynell,E. "Theory and Practice in Ex
perimental Bacteriology"., 2nd. Cambridgge Univer-

sity Press, 1970.

- 70.- Mulder, E.G., "Arthrobacter" in "Principles and Applications in Aquatic Microbiology". John Wiley and Sons, Inc. New York, 1964.
- 71.- Murray, H.C. Sebek, O.K., U.S. Patent, 2, 102, 411. September, 1959.
- 72.- Nesemann, G. Hubener, H.J. Junk, R. y Schmidt-Thomé, J. Biochem. 2., 333, 88, 1960.
- 73.- Nobile, A. Charney, N.J. Am. Chem. Soc, 77, 4184, 1955.
- 74.- Ørskov, F. y Ørskov, I. Acta Path, Microb, Scand, 51, 280, 1961.
- 75.- Ortíz de Landazuri, M. Tesis Doctoral, Fac. de Med. Univ. de Navarra, Enero, 1970.
- 76.- Pelichová, M. Suzuki, T. y Cinader, B. J. of Immunology, 104, 1, 195, 1970.
- 77.- Penasse, L. Baulieu, E.F. Abh. Dent. Akad, Wiss, Berlín, Kl. Med. 1968, N^o. 2, 201-11, Pb. 1989.
- 78.- Penasse, L. Peyre, M. Steroids, 12(4), 525-44 (Eng), 1968.
- 79.- Perlman, D. O'Brien, E. Bayan, A. P. Greenfield, R. B. J. Bacterial, 69, 347, 1955.
- 80.- Perlman, D., Titus, E., y Fried, J., J. Am Chem. Soc. 74. 2126, 1952.

- 81.- Peterson, D.H., "Biochemistry of Industrial Microorganisms". Academic Press. N.Y., 1963.
- 82.- Ringol, H.J., Gut, M. Hayand, M. y Turner, A. Tetraedron Letters, 835, 1962.
- 83.- Rovira, A.D. y Brisbane, P.G., "Numerical Taxonomy and Soil Bacteria", p. 337, en "The Ecology of Soil Bacteria". Editado por Gray, T.R.G. y Parkinson, D. Liverpool University Press, 1968.
- 84.- Sargent. "Methods in Zone Electrophoresis", 2^a Ed. B.D.H. Chem. Ltd.
- 85.- Scheidegger, J.J. Inter. Arch. Allergy, 7, 103, 1955.
- 86.- Schmidt-Thomé, J. Neemann, G. Hubener, H.J. Ales-ter, I. Biochem. 2., 336, 322, 1960.
- 87.- Shirasaka, M. Ozaki, M. Sugawara, S.J. Ferm. Assoc. (Japan), 19, 335, 1961.
- 88.- Sih, C.J. Biochem, Biophys, Acta, 62, 541, 1962.
- 89.- Sih, C.J., Wang, K.C., J. Am. Chem. Soc., 85, 2135, 1962.
- 90.- Sih, C.J. Wang, K.C. Gibson, D.T. Whitlock, H.W., H. J. Am., Chem. Soc. 87, 1386, 1965.
- 91.- Sih, C. J. Weisenborn, F.L., J. Am. Chem. Soc., 82, 2653, 1960.

- 92.- Skyring, G.N. y Quadling, C. Can. J. Microbiol, 16,
(2), 95, 1970.
- 93.- Sneath, P.H.A., Lederberg, J. Proc. Nat. Acad. Sci.
U.S., 47, 86, 1961.
- 94.- Soda, K. Misono, H. Mori, K. Sakato, H. Biochem. Bio-
phys, Res. Comm. 44(4), 931, 1971.
- 95.- Stefanovic, V. Hayand, M. Dorfman, R.I. Biochem.
Biophys, Acta, 71, 429, 1963.
- 96.- Stocker, B.A.D., Staub, A.M., Tinelli, R., y Kopac-
ka, B. Ann. Inst. Pasteur, 98, 505, 1960.
- 97.- Stodola, F.H., "Chemical Transformations by Microor-
ganisms", Wiley, New York, 1958.
- 98.- Stoudt, F.H. Adv. in App. Microbiol, 2, 183, 1960.
- 99.- Stoudt, F.H. Mcaher, N.S. Chmerda, J.M. y Kozlowski
M.A. Arch. Biochem. Biophys, 59, 304, 1955.
- 100.- Sutherland, E.W. Hardman, J.G. Butcher, R.W., Broa-
dus, A.E. Progr. Endocrin., I.C.S., 184, 26, 1969.
- 101.- Sutter, D. Charney. W., O'Neill, P.L. Carvajal, F.
Herzog, H.L. y Hershberg, E.B., J. Org. Chem. 22,
578, 1957.
- 102.- Suzuki, T. Pelichová, H. Cinader, B.J. of Immunolo-
gy, 103, N^o. 6, 1366. 1969.
- 103.- Talalay, P. Ann.Rev.Biochem., 34, 347, 1965.
- 104.- Teixeira, F.J. Tesis Doctoral, Fac. de Med. Univ.
de Navarra, Abril, 1972.

- 105.- Thoma, R.W. Fried, J. Bonanno, S. y Grabonwich, P.
J. Am. Chem. Soc., 79, 4818, 1957.
- 106.- Tormo, J. Chordi, A. Nature, 205, 983, 1965.
- 107.- Tsuda, K. Iizuka, H. Sato, Naito, A. Chem. & Pharm.
Bull (Tokyo), 9, 925, 1961.
- 108.- Tsuda, K. Iizuka, H. Ohki, E., Sato, Y. Naito, A. y
Hattore, M.J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 12., 1961.
- 109.- Vézina, C. Sehgal, S.N. y Singh, K. Appl. Microbio-
logy, 11, 50, 1963.
- 110.- Vischer, E. Meystre, Ch. y Wettstein, A. Helv. Chim.
Acta, 38, 835, 1955.
- 111.- Vischer, E. Meystre, Ch., y Wettstein, A. Helv, Chim
Acta, 38, 1502, 1955.
- 112.- Vischer, E. y Wettstein, A. Experientia, 9, 371, 1953.
- 113.- Vischer, E., y Wettstein, A. Advances in Enzimol., 20
237, 1958.
- 114.- Vogel, H.J., Proc. Can. Cáncer. Res. Conf., 1966.
7, 133-8. 1967
- 115.- Watanabe, T. Bacteriol. Rev., 27, 87, 1963.
- 116.- Watson, J.D.. "Molecular Biology of the Gene". Benja-
mín, New York, 1965.
- 117.- Williams, C.A. y Case, M.W., "Methods in Immunolo-
gy and Immunochemistry" American Press, Vol. I, II,
y III., 1967, 1968, y 1971.

- 118.- Wilson, G.S. y Miles, A.A., Topley and "Principles of Bacteriology and Immunity". Ed., Arould, 1966.
- 119.- Yielding, K.L. Tomkins, G.M. Biochim, Biophys, Acta. 39, 348, 1958.
- 120.- Zagallo, A.C. Wang, C.H. J. Gen. Microbiol, 29, 389, 1962.